

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 940 681**

51 Int. Cl.:

| | |
|-------------------|-----------|
| A61K 35/28 | (2015.01) |
| A61K 35/12 | (2015.01) |
| A61P 35/00 | (2006.01) |
| A61K 31/52 | (2006.01) |
| A61P 37/02 | (2006.01) |
| A61P 35/02 | (2006.01) |
| A61P 37/06 | (2006.01) |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.07.2018 PCT/US2018/042630**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **24.01.2019 WO19018491**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2018 E 18750006 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.12.2022 EP 3654994**

54 Título: **Un interruptor modulable para la selección de células modificadas donantes**

30 Prioridad:

18.07.2017 US 201762533707 P

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

10.05.2023

73 Titular/es:

CSL BEHRING GENE THERAPY, INC. (50.0%)
35 N. Lake Avenue, Suite 650
Pasadena, CA 91101, US y
CSL GENE THERAPY PTY LTD (50.0%)

72 Inventor/es:

ALMA, CHRISTOPHER WALTER;
BARTLETT, JEFFREY;
BRETON, LOUIS RANDALL;
SYMONDS, GEOFFREY PHILLIP y
YAN, MING

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

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

ES 2 940 681 T3

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

Un interruptor modulable para la selección de células modificadas donantes

5 **CAMPO DE DIVULGACIÓN**

Esta divulgación se refiere de manera general a campos de la biología molecular y, en particular, a vectores y células huésped transducidas por vectores.

10 **ANTECEDENTES DE LA DIVULGACIÓN**

El uso de un trasplante de células madre alogénico (alo-SCT) como opción terapéutica para enfermedades que de otro modo serían letales está aumentando continuamente. Sin embargo, la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) sigue siendo una complicación importante del alo-SCT que afecta hasta aproximadamente el 40-60% de los pacientes con alo-SCT. Se cree que la GVHD se produce cuando las células inmunocompetentes, concretamente los linfocitos T, reconocen los antígenos de membrana en las células huésped. Estos antígenos de membrana incluyen un conjunto de polipéptidos huésped, como los antígenos de histocompatibilidad mayor y menor presentados por el sistema de antígenos leucocitarios humanos. Se cree que el polimorfismo de estos polipéptidos desencadena la activación de las células T y, en última instancia, la lesión tisular a través de una variedad de mecanismos efectores celulares. La activación de las células inmunitarias donantes aumenta también por las citoquinas liberadas desde el sitio de la lesión tisular asociada con el régimen de acondicionamiento intenso ("tormenta de citoquinas").

La GVHD aguda (aGVHD) se produce habitualmente en los primeros 100 días después del trasplante, mientras que el inicio de la GVHD crónica (cGVHD) se observa más tarde. Se han observado cambios en el período de inicio de las GVHD tanto agudas como crónicas, con casos agudos produciéndose aproximadamente 100 días después del trasplante y casos crónicos notados antes de lo habitual. Estos cambios de los patrones tradicionales de GVHD aguda y crónica se observaron especialmente en el contexto de una intensidad de acondicionamiento reducida y el uso de sangre periférica como fuente de células madre. Como se usa en la presente, el término "GVHD" abarca tanto la enfermedad de injerto contra huésped aguda como crónica.

El objetivo del trasplante de células progenitoras hematopoyéticas o de células madre (HSCT) es lograr el injerto con éxito de las células donantes dentro de un huésped receptor, de tal manera que se produzca un quimerismo inmunitario y/o hematopoyético. Tales trasplantes típicamente se usan en el tratamiento de trastornos como la leucemia, los síndromes de insuficiencia de médula ósea y los trastornos hereditarios (por ejemplo, anemia de células falciformes, talasemia, trastornos de inmunodeficiencia y enfermedades de almacenamiento metabólico como la mucopolisacaridosis), así como el linfoma de bajo grado. El quimerismo es la reconstitución de los varios compartimentos del sistema hematoimmune del receptor con poblaciones de células donantes que portan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) derivadas de un donante alogénico o xenogénico, y una población celular derivada del receptor o, alternativamente, los compartimentos del sistema hematoimmune del receptor que pueden reconstituirse con una población celular portadora de moléculas MHC derivadas únicamente del donante de médula alogénica o xenogénica. El quimerismo puede variar del 100% (reemplazo total por células alogénicas o xenogénicas) hasta niveles bajos detectables solo por métodos moleculares. Los niveles de quimerismo pueden variar con el tiempo y ser permanentes o "temporales".

La infusión de leucocitos de donante (DLI) se ha usado después de un alotrasplante para tratar la enfermedad en recaída o residual, para convertir el quimerismo de donante mixto en completo, para restaurar la función inmunitaria completa como un 'complemento' después de trasplantes con agotamiento de células T y como profilaxis contra recaída como terapia preventiva. Las principales complicaciones después de la DLI incluyen GVHD aguda y crónica e infecciones asociadas con aplasia de la médula o el uso de inmunosupresores. En la mayoría de los ensayos, hasta aproximadamente el 60% de los receptores evaluables de DLI desarrollan GVHD. La GVHD se correlaciona con la actividad y la respuesta de GVT en algunos los estudios, pero no en todos.

A lo largo de los años, se han propuesto varios métodos para la profilaxis y el tratamiento de la GVHD, como medicamentos inmunosupresores, manipulación de injertos y terapias celulares. De hecho, existen varios enfoques para minimizar la GVHD después de DLI para prevenir o mitigar la inmunodeficiencia posterior al trasplante o para inducir el injerto contra enfermedad maligna (GVM) en enfermedad residual o recurrente. Por ejemplo, un enfoque que parece minimizar la GVHD implica la administración de DLI en dosis bajas seguido de una ampliación a escala de la dosis. El enfoque convencional para la DLI ha sido infundir dosis individuales "a granel" que contienen cantidades variables de células T CD3+, pero se cree que esto está asociado con incidencias significativas de GVHD aguda y crónica y ocasionalmente con la muerte. Por otro lado, la transfusión de linfocitos de donante en múltiples alícuotas, comenzando con un número bajo de células y aumentando la dosificación a intervalos variables según sea necesario puede reducir la incidencia de GVHD (consultar Mackinnon S, Papadopoulos EB, Carabasi MH, et al. Adoptive immunotherapy evaluating escalating doses of donor leukocytes for relapse of chronic myeloid leukemia after bone marrow transplantation: separation of graft-versus-leukemia responses from graft-versus-host disease.

Blood. 1995;86:1261-1268). La suposición subyacente al uso de un régimen de dosis creciente es que la incidencia de la GVHD aumenta con la dosis de células total administrada. Por tanto, se cree que la identificación de la dosis celular mínima capaz de inducir la remisión reduciría el riesgo de GVHD.

5 Alternativamente, se cree que la GVHD puede reducirse mediante el agotamiento de los linfocitos CD8+, que se cree que incluyen la mayoría de las células responsables de mediar en la GVHD (es decir, el agotamiento de las células efectoras de GVH). Los resultados sugieren que la actividad de injerto contra leucemia puede conservarse con una GVHD mínima. En un pequeño número de pacientes, la mayoría de las respuestas se mantuvieron, aunque el impacto clínico general de este enfoque requerirá una comparación directa con la DLI no manipulada.

10 También se cree que la GVHD puede reducirse mediante la inactivación de las células efectoras de la GVHD. De hecho, la DLI de células T del donante irradiadas se basa en la hipótesis de que las células inducirían efectos de GVM en el momento de la infusión pero no podrían proliferar en respuesta a los aloantígenos. Además, se estudió el uso de células T donantes que expresan el gen de la timidina quinasa del herpes simple seguido de tratamiento con ganciclovir por sus efectos relacionados con la modulación de la alorreactividad que se produce después del trasplante de médula ósea.

15 La terapia de combinación de inhibidores de la calcineurina y metotrexato (MTX) se ha usado con éxito para reducir la incidencia y la gravedad de la GVHD y es el tratamiento estándar para la profilaxis de la GVHD. Se cree que el MTX, uno de los primeros fármacos usados para la profilaxis de la GVHD, inhibe la dihidrofolato reductasa y la producción de timidilato y purinas, suprimiendo de este modo la respuesta y la proliferación de células T, así como la expresión de moléculas de adhesión.

20 Aunque algunas de estas estrategias son eficaces para reducir la incidencia de GVHD, estas estrategias se asocian a menudo con una reducción significativa en el efecto de GVM, lo que pone en peligro la eficacia general del HSCT.

25 Wagner et al, se refieren a la desactivación mediada por CRISPR como una nueva herramienta de selección e interruptor de suicidio para las células T modificadas genéticamente.

30 Hacke et al, Experimental Hematology (2011) vol 40(1) páginas 3-13, se refiere al uso de 6-tioguanina para el preacondicionamiento combinado y la quimioselección *in vivo* para lograr la reconstitución de la hematopoyesis normal en la médula ósea deficiente en HPRT.

35 Choudary et al, PLOS One (2013) vol 8 (3) página e59594, se refiere al silenciamiento de HPRT para la selección de células progenitoras hematopoyéticas humanas modificadas genéticamente.

40 Hacke et al, Transplantation Proceedings (2013) vol. 45(5), páginas 2040-2044, se refiere a la modificación genética de médula ósea de ratón mediante la administración mediada por vectores lentivirales de ARN de horquilla corta de hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa y que confiere quimioprotección frente a la 6-tioguanina.

45 La US 2013/122591 se refiere a nucleasas y métodos de uso de nucleasas para la modificación de un locus de HPRT y para aumentar la frecuencia de modificación génica en un locus objetivo.

La WO 2012/145723 se refiere a un método de trasplante de células madre hematopoyéticas (HSC) libres de radiación que comprende administrar a un sujeto mamífero una o dos dosis de 2 a 10 mg/kg de peso corporal de un análogo de base de purina, como 6TG como paso de preacondicionamiento.

50 La WO 2018/094126 se refiere a métodos de selección de células madre modificadas *in vivo*, programas de dosificación de 6TG y formulaciones orales que comprenden 6TG.

55 La WO 2017/143266 se refiere a ARN de horquilla corta potentes (ARNhc734) dirigidos a la hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (HPRT) que mejora la tasa de injerto de células madre modificadas genéticamente mediante una estrategia de acondicionamiento y selección *in vivo* que se usa para conferir resistencia a un antimetabolito análogo de guanina disponible clínicamente, 6TG, para una selección positiva eficiente de células madre modificadas genéticamente.

60 La WO 2017/025323 se refiere a métodos para desarrollar células inmunitarias manipuladas genéticamente para inmunoterapia, que pueden dotarse de receptores de antígenos quiméricos dirigidos a un marcador de antígeno que es común tanto para las células patológicas como para dichas células inmunitarias CD38, por el hecho de que los genes que codifican dichos marcadores están inactivados en las células inmunitarias por una endonucleasa de corte raro como TALEN, Cas9 o argonaute.

65

BREVE RESUMEN

La presente invención proporciona una composición que comprende linfocitos deficientes en HPRT para su uso en un método para prevenir o mitigar la inmunodeficiencia posterior al trasplante a la vez que se mitigan los efectos secundarios, el método comprendiendo:

- (a) generar linfocitos deficientes en HPRT ex vivo;
- (b) seleccionar positivamente los linfocitos deficientes en HPRT ex vivo para proporcionar una población de linfocitos modificados, en donde los linfocitos deficientes en HPRT se generan a través del silenciamiento del gen de HPRT;
- (c) administrar la población de linfocitos modificados al paciente al mismo tiempo o después de la administración de un injerto de HSC alogénico; y
- (d) opcionalmente administrar MTX si aparecen efectos secundarios.

La invención está definida por las reivindicaciones y cualquier otro aspecto, configuración o realización expuesta en la presente que no esté dentro del alcance de las reivindicaciones tiene únicamente carácter informativo.

Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a las composiciones de la presente invención para su uso en dicho método de tratamiento.

En algunas realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende linfocitos deficientes en HPRT para su uso en un método para prevenir o mitigar la inmunodeficiencia posterior al trasplante a la vez que se mitigan los efectos secundarios, el método comprendiendo: generar linfocitos deficientes en HPRT a partir de una muestra de donante; seleccionar positivamente los linfocitos deficientes en HPRT ex vivo para proporcionar una población de linfocitos modificados; administrar un injerto de HSC al paciente; administrar la población de linfocitos modificados al paciente tras la administración del injerto de HSC; y opcionalmente administrar MTX si aparecen efectos secundarios.

Los linfocitos deficientes en HPRT se generan mediante el silenciamiento del gen de HPRT. En algunas realizaciones, la selección positiva comprende poner en contacto los linfocitos deficientes en HPRT generados con un análogo de purina (por ejemplo, 6-tioguanina (6TG), 6-mercaptopurina (6-MP) o azatiopurina (AZA)). En algunas realizaciones, la selección positiva comprende poner en contacto los linfocitos deficientes en HPRT generados con un análogo de purina y un segundo agente. En algunas realizaciones, el análogo de purina es 6TG. En algunas realizaciones, una cantidad de 6TG está entre aproximadamente 1 y aproximadamente 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$. En algunas realizaciones, el injerto de HSC se administra al paciente después del acondicionamiento mieloablativo. En algunas realizaciones, los linfocitos modificados se administran como un solo bolo. En algunas realizaciones, los linfocitos modificados se administran en múltiples dosis. En algunas realizaciones, cada dosis comprende entre aproximadamente $0,1 \times 10^6$ células/kg a aproximadamente 240×10^6 células/kg. En algunas realizaciones, una dosis total de linfocitos modificados comprende entre aproximadamente $0,1 \times 10^6$ células/kg y aproximadamente 730×10^6 células/kg. En algunas realizaciones, la administración de los linfocitos modificados tiene lugar de 1 a 14 días después de la administración del injerto de HSC. En algunas realizaciones, la administración de los linfocitos modificados tiene lugar de 2 a 4 semanas después de la administración del injerto de HSC. En algunas realizaciones, la administración de los linfocitos modificados tiene lugar al mismo tiempo que la administración del injerto de HSC. En algunas realizaciones, el MTX se administra opcionalmente tras el diagnóstico de GVHD. En algunas realizaciones, la cantidad de MTX administrada varía de aproximadamente $2 \text{ mg}/\text{m}^2/\text{infusión}$ a aproximadamente $8 \text{ mg}/\text{m}^2/\text{infusión}$. En algunas realizaciones, el MTX se administra en dosis tituladas.

En algunas realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende linfocitos deficientes en HPRT para su uso en un método para prevenir o mitigar la inmunodeficiencia posterior al trasplante a la vez que se mitigan los efectos secundarios, en donde el método comprende (i) administrar células T modificadas que son deficientes en HPRT al paciente (como después de un injerto de HSC); y (ii) administrar MTX al paciente tras la aparición de efectos secundarios. En algunas realizaciones, los efectos secundarios se seleccionan del grupo que consiste en aGVHD o cGVHD. En algunas realizaciones, las células T modificadas se administran en una sola dosis. En algunas realizaciones, la cantidad de células T modificadas administradas en la dosis individual varía de aproximadamente $0,1 \times 10^6/\text{kg}$ de peso corporal a aproximadamente $730 \times 10^6/\text{kg}$ de peso corporal. En algunas realizaciones, las células T modificadas se administran en múltiples dosis. En algunas realizaciones, la cantidad de células T modificadas administradas por dosis varía de aproximadamente $0,1 \times 10^6/\text{kg}$ de peso corporal y aproximadamente $240 \times 10^6/\text{kg}$ de peso corporal. En algunas realizaciones, el MTX se administra como una dosis individual. En algunas realizaciones, se administran múltiples dosis de MTX. En algunas realizaciones, la cantidad de MTX administrada varía de aproximadamente $2 \text{ mg}/\text{m}^2/\text{infusión}$ a aproximadamente $8 \text{ mg}/\text{m}^2/\text{infusión}$. En algunas realizaciones, la cantidad de MTX administrada varía de aproximadamente $2,5 \text{ mg}/\text{m}^2/\text{infusión}$ a aproximadamente $7,5 \text{ mg}/\text{m}^2/\text{infusión}$.

Los solicitantes han descubierto que una población heterogénea de células T genéticamente modificada puede proporcionar una reconstitución inmunológica más completa para pacientes inmunocomprometidos

trasplantados (por ejemplo, aquellos que tienen enfermedad de Chron grave, síndrome del intestino irritable o anemia aplásica).

Además, en comparación con otros métodos de "apagado", las células tratadas de acuerdo con los métodos divulgados no necesitan expresar un "gen suicida". (ver, por ejemplo, Di Stasi A, Tey SK, Dotti G, Fujita Y, Kennedy-Nasser A, Martinez C, Straathof K, Liu E, Durett AG, Grilley B, Liu H, Cruz CR, Savoldo B, Gee AP, Schindler J, Krance RA, Heslop HE, Spencer DM, Rooney CM, Brenner MK. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N Engl J Med.* 2011 Nov 3;365(18): 1673-83; Xu K, Zhu F, Du B, Gao F, Cheng H, Pan X. La profilaxis de la enfermedad de injerto contra huésped mediante el tratamiento por la expresión mediada por lentivirus del virus del herpes simple-timidina quinasa y ganciclovir *Transplant Proc.* Octubre de 2008;40(8):2665-9; and Philip B, Kokalaki E, Mekkaoui L, Thomas S, Straathof K, Flutter B, Marin V, Marafioti T, Chakraverty R, Linch D, Quezada SA, Peggs KS, Pule M. A highly compact epitope-based marker/suicide gene for easier and safer T-cell therapy. *Blood.* Agosto de 2014 21;124(8):1277-87). Más bien, el método divulgado proporciona el silenciamiento de un gen endógeno que no provoca efectos indeseables en las células hematológicas y, en general, resultados superiores. El solicitante afirma que debido a la quimioselección de 6TG ex vivo de células genéticamente modificadas, existe una pureza muy alta de células manipuladas para permitir la eliminación cuantitativa de células in vivo a través de la dosificación de MTX. Además, la composición que comprende linfocitos deficientes en HPRT para su uso en el tratamiento de acuerdo con los métodos divulgados proporciona dosis potencialmente más altas y una terapia más agresiva de células T donantes que la terapia donde no se incorpora un "interruptor de muerte". Además, el uso de MTX para regular el número de células T modificadas es clínicamente compatible con los métodos existentes para tratar la GVHD, es decir, donde MTX se usa para ayudar a aliviar los síntomas de GVHD en pacientes que no reciben las células T modificadas divulgadas.

Finalmente, el solicitante afirma que, en comparación con los linfocitos de donantes transducidos con el gen de la timidina quinasa del herpes simple, la composición que comprende linfocitos deficientes en HPRT para su uso en el tratamiento de acuerdo con los métodos divulgados mitiga las limitaciones, incluyendo la inmunogenicidad, lo que da como resultado la eliminación de las células y excluye la posibilidad de futuras infusiones. (ver Zhou X, Brenner MK. Improving the safety of T-Cell therapies using an inducible caspasa-9 gene. *Exp Hematol.* Noviembre de 2016;44(11): 1013-1019). Además, la composición que comprende linfocitos deficientes en HPRT para su uso en los presentes métodos permite el uso de ganciclovir para condiciones clínicas concurrentes distintas de la GVHD sin dar como resultado una depuración no deseada de linfocitos del donante HSV-tk (por ejemplo, no se impediría la administración de ganciclovir para controlar infecciones por CMV, que son comunes en el entorno de alo-HSCT, cuando se utilizan los métodos descritos actualmente).

35 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La FIG. 1 es un diagrama de flujo que ilustra los pasos para preparar células T modificadas y administrar esas células T modificadas a un paciente con necesidad de ello.

La FIG. 2 es un diagrama de flujo que ilustra los pasos para preparar células T modificadas y administrar esas células T modificadas a un paciente después de un injerto de células madre, de tal manera que el sistema inmunitario del paciente pueda reconstituirse por lo menos parcialmente.

La FIG. 3 es un diagrama de flujo que ilustra los pasos para preparar células T modificadas y administrar esas células T modificadas a un paciente después de un injerto de células madre, de tal manera que las células T modificadas ayuden a inducir el efecto de GVM.

La FIG. 4 es un diagrama de flujo que ilustra los pasos para preparar células T modificadas (células CAR-T que son deficientes en HRPT) y administrar esas células T modificadas a un paciente con necesidad de ello.

La FIG. 5 ilustra la vía de recuperación de purinas.

La FIG. 6 ilustra el camino de novo para la síntesis de dTTP.

La FIG. 7 ilustra la selección de células deficientes en HPRT en presencia de 6TG.

La FIG. 8 ilustra sh734 (SEQ ID NO: 1) impulsado por un promotor de 7sk.

Las FIGS. 9A y 9B ilustran el efecto de la selección positiva con 6TG (ex vivo) sobre células K562.

Las FIGS. 10A y 10B ilustran el efecto de la selección positiva con 6TG (ex vivo) sobre células CEM.

Las FIGS. 11A y 11B ilustran el efecto de la selección negativa con MTX sobre células K562.

Las FIGS. 12A y 12B ilustran el efecto de la selección negativa con MTX sobre células CEM.

La FIG. 13 ilustra el efecto de la selección negativa con MTX sobre células K562.

La FIG. 14 ilustra la formación de metabolitos tóxicos a partir de 6TG.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente divulgación está dirigida de manera general a la prevención, el tratamiento, la supresión, el control o la mitigación de otro modo de los efectos secundarios de la terapia con células T, la terapia con células T diseñada para acelerar la reconstitución inmunitaria.

65

Definiciones

Como se usa en la presente, los términos singulares "un", "uno" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De manera similar, se pretende que la palabra "o" incluya "y" a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una pluralidad de dichas células y una referencia a "la proteína" incluye la referencia a una o más proteínas y equivalentes de las mismas conocidas por los expertos en la técnica, y demás. Todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por los expertos en la técnica a la que pertenece esta divulgación, a menos que se indique claramente lo contrario.

Como se usa en la presente en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, debe entenderse que la frase "por lo menos uno", en referencia a una lista de uno o más elementos, significa por lo menos un elemento seleccionado de uno cualquiera o más de los elementos en el lista de elementos, pero sin incluir necesariamente por lo menos uno de todos y cada uno de los elementos enumerados específicamente en la lista de elementos y sin excluir ninguna combinación de elementos en la lista de elementos. Esta definición también permite que opcionalmente puedan estar presentes elementos distintos de los elementos específicamente identificados dentro de la lista de elementos a los que se refiere la frase "por lo menos uno", ya esté relacionado o no con esos elementos específicamente identificados. Así, como ejemplo no limitativo, "por lo menos uno de A y B" (o, equivalentemente, "por lo menos uno de A o B", o, equivalentemente, "por lo menos uno de A y/o B") puede referirse, en una realización, a por lo menos uno, que incluye opcionalmente más de uno, A, sin B presente (y que incluye opcionalmente elementos distintos de B); en otra realización, a por lo menos uno, que incluye opcionalmente más de uno, B, sin A presente (y que incluye opcionalmente elementos distintos de A); en otra realización más, a por lo menos uno, que incluye opcionalmente más de uno, A, y por lo menos uno, que incluye opcionalmente más de uno, B (y que incluye opcionalmente otros elementos); etc.

Los términos "que comprende", "que incluye", "que tiene" y similares se usan indistintamente y tienen el mismo significado. De manera similar, "comprende", "incluye", "tiene" y similares se usan indistintamente y tienen el mismo significado. Específicamente, cada uno de los términos se define de acuerdo con la definición común de la ley de patentes de los Estados Unidos de "que comprende" y, por lo tanto, se interpreta como un término abierto que significa "por lo menos lo siguiente", y también se interpreta que no excluye características, limitaciones, aspectos, etc. adicionales. Así, por ejemplo, "un dispositivo que tiene los componentes a, b y c" significa que el dispositivo incluye por lo menos los componentes a, b y c. De manera similar, la frase: "un método que implica los pasos a, b y c" significa que el método incluye por lo menos los pasos a, b y c. Además, aunque los pasos y procesos pueden describirse en un orden particular, los expertos en la técnica reconocerán que la ordenación de los pasos y los procesos puede variar.

Como se usa en la presente en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, debe entenderse que "o" tiene el mismo significado que "y/o" como se ha definido anteriormente. Por ejemplo, al separar elementos en una lista, se interpretará que "o" o "y/o" son inclusivos, es decir, la inclusión de por lo menos uno, pero también incluye más de uno, de un número o lista de elementos, y, opcionalmente, artículos adicionales no enumerados. Solo los términos que indiquen claramente lo contrario, como "solo uno de" o "exactamente uno de" o, cuando se usan en las reivindicaciones, "consiste en", se referirán a la inclusión de exactamente un elemento de un número o lista de elementos. En general, el término "o" como se usa en la presente solo se interpretará como una indicación de alternativas exclusivas (es decir, "uno o el otro, pero no ambos") cuando va precedido de términos de exclusividad, como "cualquiera", "uno de", "solo uno de" o "exactamente uno de". "Consistente esencialmente en", cuando se usa en las reivindicaciones, tendrá su significado ordinario tal como se usa en el campo de la ley de patentes.

Como se usa en la presente, el término "administración", tal como se aplica a un sujeto o paciente, un sujeto de placebo, un sujeto de investigación, un sujeto experimental, una célula, un tejido, un órgano o un fluido biológico se refiere, sin limitación, al contacto de un ligando exógeno, reactivo, placebo, molécula pequeña, agente farmacéutico, agente terapéutico, agente de diagnóstico o composición con el sujeto, célula, tejido, órgano o fluido biológico, y similares. "Administración" puede referirse, por ejemplo, a métodos terapéuticos, farmacocinéticos, de diagnóstico, de investigación, de placebo y experimentales. El tratamiento de una célula abarca el contacto de un reactivo con la célula, así como el contacto de un reactivo con un fluido, donde el fluido está en contacto con la célula. "Administración" también abarca tratamientos in vitro y ex vivo, por ejemplo, de una célula, por una composición de reactivo, diagnóstico, de unión, o por otra célula.

"Célula T alogénica" se refiere a una célula T de un donante que tiene un tipo de HLA de tejido que coincide con el del receptor. Típicamente, la coincidencia se realiza en base a la variabilidad en tres o más loci del gen de HLA, y se prefiere una coincidencia perfecta en estos loci. En algunos casos, los donantes de trasplantes alogénicos pueden estar relacionados (habitualmente, un hermano con compatibilidad de HLA cercana), ser singénicos (un gemelo 'idéntico' monocigótico del paciente) o no relacionados (donante que no está relacionado y se descubrió que tiene un grado muy cercano de compatibilidad de HLA). Los genes de HLA se dividen en dos categorías (Tipo I y Tipo II). En general, los malapareamientos de los genes de tipo I (es decir, HLA-A, HLA-B o HLA-C) aumentan el riesgo de rechazo del injerto. Un malapareamiento de un gen de HLA tipo II (es decir, HLA-DR o HLA-DQB1) aumenta el riesgo de enfermedad de injerto contra huésped.

Como se usa en la presente, los términos "CAR T" o "células CAR-T" se refieren a una célula T o una población de las mismas, que se ha modificado mediante métodos para que expresen un receptor de antígeno quimérico (CAR) en la superficie de la célula T. El CAR es un polipéptido que tiene una especificidad de unión predefinida a un objetivo deseado expresado operativamente conectado con (por ejemplo, como una fusión, cadenas separadas enlazadas por uno o más enlaces disulfuro, etc.) la parte intracelular de un dominio de activación de células T.

Como se usa en la presente, los términos "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" abarcan, sin limitación, una cantidad que puede mejorar, suprimir, controlar, revertir, mitigar, prevenir o diagnosticar un síntoma o signo de una afección o trastorno médico. A menos que se indique lo contrario, explícitamente o por el contexto, una "cantidad eficaz" no se limita a una cantidad mínima suficiente para mejorar, suprimir, controlar o revertir una afección.

Como se usa en la presente, los términos "trasplante de células hematopoyéticas" se refiere al trasplante de médula ósea, trasplante de células madre de sangre periférica, trasplante de sangre de la vena umbilical o cualquier otra fuente de células madre hematopoyéticas pluripotentes. De igual manera, los términos "trasplante de células madre" o "trasplante" se refieren a una composición que comprende células madre que están en contacto con (por ejemplo, suspendidas en) un portador farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones pueden administrarse a un sujeto a través de un catéter.

Como se usa en la presente, "HPRT" es una enzima implicada en el metabolismo de las purinas codificada por el gen de HPRT1. HPRT1 está localizado en el cromosoma X y, por lo tanto, está presente en una sola copia en los hombres. HPRT1 codifica la transferasa que cataliza la conversión de hipoxantina en monofosfato de inosina y de guanina en monofosfato de guanosina mediante la transferencia del grupo 5-fosforobilo del 5-fosforribosil 1-pirofosfato a la purina. La enzima funciona principalmente para recuperar purinas del ADN degradado para su uso en la síntesis renovada de purinas (ver la FIG. 5).

Como se usa en la presente, el término "silenciamiento" cuando se usa en referencia a un efecto de ARNi en la expresión génica, significa que el nivel de expresión génica se inhibe o se reduce a un nivel por debajo del generalmente observado cuando se examina bajo sustancialmente las mismas condiciones, pero en ausencia de ARNi.

Como se usa en la presente, el término "desactivación" se refiere a la supresión parcial o completa de la expresión de un gen endógeno. Esto generalmente se logra eliminando una porción del gen o reemplazando una porción con una segunda secuencia, pero también puede estar provocado por otras modificaciones en el gen como la introducción de codones de parada, la mutación de aminoácidos críticos, la eliminación de una unión de intrones, etc. Por consiguiente, un constructo de "desactivación" es una secuencia de ácido nucleico, como un constructo de ADN, que, cuando se introduce en una célula, da como resultado la supresión (parcial o completa) de la expresión de un polipéptido o proteína codificada por ADN endógeno en la célula. En algunas realizaciones, una "desactivación" incluye mutaciones como una mutación puntual, una inserción, una delección, un cambio de marco o una mutación de sentido erróneo.

Como se usa en la presente, el término "vector lentiviral" se usa para indicar cualquier forma de un ácido nucleico derivado de un lentivirus y usado para transferir material genético a una célula mediante transducción. El término abarca ácidos nucleicos de vectores lentivirales, como ADN y ARN, formas encapsuladas de estos ácidos nucleicos y partículas virales en las que se han empaquetado los ácidos nucleicos de vectores virales.

Como se usa en la presente, los términos "sujeto" o "paciente" se refieren a un animal vertebrado, incluyendo un mamífero. Un humano, homo sapiens, se conside un sujeto o paciente.

Como se usa en la presente, el término "receptor de células T" o "TCR" se refiere a un complejo de proteínas de membrana que participan en la activación de las células T en respuesta a la presentación del antígeno. Se cree que el TCR es responsable de reconocer antígenos unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad. El TCR está compuesto por un heterodímero de cadena alfa (α) y beta (β), aunque en algunas células el TCR consiste en cadenas gamma y delta (γ/δ). Los TCR pueden existir en formas alfa/beta y gamma/delta, que son estructuralmente similares pero tienen funciones y localizaciones anatómicas distintas. Cada cadena está compuesta por dos dominios extracelulares, un dominio variable y uno constante. En algunas realizaciones, el TCR puede modificarse en cualquier célula que comprenda un TCR incluyendo, por ejemplo, una célula T auxiliar, una célula T citotóxica, una célula T de memoria, una célula T reguladora, una célula T asesina natural y una célula T gamma delta.

Como se usa en la presente, los términos "célula T modificada con TCR" o "células T TCTTCR modificadas" significan células T que comprenden especificidad alterada o que carecen de expresión de un TCR funcional. En algunas realizaciones, las células T modificadas con TCR están modificadas de tal manera que poseen una actividad de eliminación de tumores potenciada, es decir, están modificadas de tal manera que reconocen

eficazmente las células tumorales portadoras de antígenos.

Como se usa en la presente, el término "titulación" se refiere al ajuste continuo de una dosis en función de la respuesta del paciente. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ajustarse hasta que se observe o logre un efecto clínico deseado.

Como se usa en la presente, los términos "transducir" o "transducción" se refieren a la administración de un gen o genes usando un vector viral o retroviral por medio de infección en lugar de transfección. Por ejemplo, un gen anti-VIH portado por un vector retroviral (un retrovirus modificado usado como vector para la introducción de ácido nucleico en las células) puede transducirse en una célula a través de la infección y la integración del provirus. Por tanto, un "gen transducido" es un gen que se ha introducido en la célula mediante infección lentiviral o de vector e integración de provirus. Los vectores virales (por ejemplo, "vectores de transducción") transducen genes en "células objetivo" o células huésped.

Como se usa en la presente, los términos "tratamiento", "que trata" o "tratar", con respecto a una afección específica, se refieren a obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir total o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de curar parcial o completamente una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. "Tratamiento", como se usa en la presente, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un sujeto, particularmente en un humano, e incluye: (a) prevenir que se produzca la enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que aún no se ha diagnosticado que la tenga; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; y (c) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad y/o aliviar uno o más síntomas de la enfermedad. "Tratamiento" también puede abarcar administrar un agente o la administración de una terapia para proporcionar un efecto farmacológico, incluso en ausencia de una enfermedad o afección. El término "tratamiento" se usa en algunas realizaciones para referirse a la administración de un compuesto de la presente divulgación para mitigar una enfermedad o un trastorno en un huésped, preferiblemente en un sujeto mamífero, más preferiblemente en humanos. Por tanto, el término "tratamiento" puede incluir: prevenir que se produzca un trastorno en un huésped, particularmente cuando el huésped está predispuesto a adquirir la enfermedad pero aún no se le ha diagnosticado la enfermedad; inhibir el trastorno; y/o aliviar o revertir el trastorno. En la medida en que los métodos de la presente divulgación están dirigidos a prevenir los trastornos, se entiende que el término "prevenir" no requiere que el estado patológico se impida completamente. Más bien, como se usa en la presente, el término prevención se refiere a la capacidad del experto en la técnica para identificar una población que es susceptible a trastornos, de tal manera que la administración de los compuestos de la presente divulgación puede producirse antes del inicio de una enfermedad. El término no significa que el estado de enfermedad deba evitarse por completo.

Como se usa en la presente, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de mediar en la entrada de, por ejemplo, transferir, transportar, etc., otra molécula de ácido nucleico en una célula. El ácido nucleico transferido generalmente se une, por ejemplo, se inserta en la molécula de ácido nucleico del vector. Un vector puede incluir secuencias que dirigen la replicación autónoma o puede incluir secuencias suficientes para permitir la integración en el ADN de la célula huésped. Como será evidente para un experto en la técnica, los vectores virales pueden incluir varios componentes virales además del o los ácidos nucleicos que median la entrada del ácido nucleico transferido. En la técnica se conocen numerosos vectores que incluyen, pero no se limitan a, polinucleótidos lineales, polinucleótidos asociados con compuestos iónicos o anfífilos, plásmidos y vectores virales. Los ejemplos de vectores virales incluyen, pero no se limitan a, vectores adenovirales, vectores de virus adenoasociados, vectores retrovirales (incluyendo vectores lentivirales), y similares.

Preparación de células T deficientes en HPRT ("células T modificadas")

La presente invención implica un método para producir células T deficientes en HPRT (también denominadas en la presente "células T modificadas"). Con referencia a la FIG. 1, primero se recogen las células, concretamente los linfocitos (células T), de un donante (etapa 110). En realizaciones donde las células madre hematopoyéticas (HSC) también se recogen de un donante, las células T pueden recogerse del mismo donante del que se recoge el injerto de HSC o de un donante diferente. En estas realizaciones, las células pueden recogerse al mismo tiempo o en un momento diferente que las células para el injerto de HSC. En algunas realizaciones, las células se recogen de la misma cosecha de HSC de sangre periférica movilizada. En algunas realizaciones, esto podría ser una fracción negativa para CD34 (células positivas para CD34 recogidas según el estándar de atención para el injerto de donante), o una parte del injerto de HSC positivo para CD34 si se prevé un injerto de células T progenitoras.

El experto en la técnica apreciará que las células pueden recogerse por cualquier medio. Por ejemplo, las células pueden recogerse por aféresis, leucoféresis o simplemente a través de una simple extracción de sangre venosa. En realizaciones en las que el injerto de HSC se recoge al mismo tiempo que las células para su modificación, el injerto de HSC se crioconserva para dar tiempo a la manipulación y prueba de las células T recogidas.

Después de la recogida de las células, se aíslan las células T (paso 120). Las células T pueden aislarse del agregado de células recogidas mediante cualquier medio conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las células CD3+ pueden aislarse de las células recogidas mediante microperlas CD3 y el sistema de separación MACS (Miltenyi Biotec). Se cree que el marcador de CD3 se expresa en todas las células T y está asociado con el receptor de células T. Se cree que aproximadamente del 70 al 80% de los linfocitos de sangre periférica humana y aproximadamente del 65 al 85% de los timocitos son CD3+. En algunas realizaciones, las células CD3+ se marcan magnéticamente con microperlas CD3. Luego, la suspensión celular se carga en una columna MACS que se coloca en el campo magnético de un separador MACS. Las células CD3+ marcadas magnéticamente se retienen en la columna. Las células sin marcar pasan y esta fracción de células se agota de células CD3+. Después de retirar la columna del campo magnético, las células CD3+ retenidas magnéticamente pueden eluirse como la fracción celular seleccionada positivamente.

Alternativamente, las células T CD62L+ pueden aislarse de las células recogidas mediante un kit de aislamiento de estrepameros CD62L Fab IBA life sciences CD62L. El aislamiento de células T CD62L+ humanas se realiza mediante selección positiva. Las PBMC se marcan con estrepameros Fab CD62L magnéticos. Las células marcadas se aíslan en un imán fuerte donde migran hacia la pared del tubo en el lado del imán. Esta fracción de células positivas para CD62L se recoge y las células se liberan de todos los reactivos de marcado mediante la adición de biotina en un imán potente. Los estrepameros magnéticos migran hacia la pared del tubo y las células sin marcador permanecen en el sobrenadante. La biotina se elimina por lavado. La preparación de células resultante está altamente enriquecida con células T CD62L+ con una pureza de más del 90%. No se necesitan pasos de agotamiento ni columnas.

En realizaciones alternativas, las células T no se aíslan en el paso 120, sino que el agregado de células recogidas en el paso 110 se usa para la modificación posterior. Mientras que en algunas realizaciones el agregado de células puede usarse para la modificación posterior, en algunos casos el método de modificación puede ser específico para una población celular particular dentro del agregado total de células. Esto podría hacerse de varias maneras; por ejemplo, dirigiendo la modificación genética a un tipo de célula particular dirigiendo la administración de vectores génicos, o dirigiendo la expresión de, por ejemplo, un ARNhc a HPRT a un tipo de célula particular, es decir, células T.

Después del aislamiento de las células T, las células T se tratan para disminuir la actividad de HPRT (paso 130), es decir, para aumentar la expresión del gen de HPRT. Las células T pueden modificarse de acuerdo con varios métodos. En algunas realizaciones, las células T pueden modificarse utilizando una técnica de interferencia de ARN. El ARN de interferencia (ARNi) se ha convertido recientemente en un enfoque genético importante para el silenciamiento postranscripcional de la expresión génica desencadenando la degradación de transcripciones homólogas a través de un complejo proceso enzimático de varios pasos que implica ARN de interferencia pequeño (ARNip) de doble cadena específico de secuencia. En algunas realizaciones, las células T pueden modificarse mediante transducción con un vector, por ejemplo, un vector lentiviral, que codifica un ARNhc dirigido al gen de HPRT. En algunas realizaciones, el ARNhc puede incorporarse dentro de un marco de ARNmi (ARNami), en otras realizaciones, el ARNhc puede ser del diseño de Ago-ARNhc independiente de Dicer. Aquí, los constructos precursores de ARNhc se procesan intracelularmente para generar dúplex de ARNip. Los vectores lentivirales han surgido como herramientas potentes y versátiles para este propósito ya que ofrecen la capacidad de infectar eficientemente una amplia variedad de tipos de células primarias, ya sea que se dividan o no, y pueden lograr una integración del vector estable en el genoma de la célula objetivo, permitiendo de este modo una modificación a largo plazo del fenotipo celular. En algunas realizaciones, el vector lentiviral es un vector lentiviral autoinactivante. Los métodos para preparar un vector lentiviral adecuado se describen en Hacke K, et al., Genetic modification of mouse bone marrow by lentiviral vector-mediated delivery of hypoxanthine-Guanine phosphoribosyltransferase short hairpin RNA confers chemoprotection against 6-thioguanine cytotoxicity, Transplant Proc. junio de 2013;45(5):2040-4. En realizaciones alternativas, las células T pueden modificarse mediante transducción con vectores lentivirales no integradores u otros vectores virales (vectores AAV).

En algunas realizaciones, el ARNhc tiene una secuencia que tiene por lo menos un 80% de identificación con la de la SEQ ID NO: 1. En otras realizaciones, el ARNhc tiene una secuencia que tiene por lo menos un 90% de identificación con la de la SEQ ID NO: 1. En otras realizaciones más, el ARNhc tiene una secuencia que tiene por lo menos un 95% de identidad con la de la SEQ ID NO: 1. En otras realizaciones más, el ARNhc tiene una secuencia que tiene por lo menos un 97% de identidad con la de la SEQ ID NO: 1. En más realizaciones adicionales, el ARNhc tiene una secuencia que tiene por lo menos un 98% de identidad con la de la SEQ ID NO: 1. En otras realizaciones más, el ARNhc tiene una secuencia que tiene por lo menos un 99% de identidad con la de la SEQ ID NO: 1. Otras moléculas de ARNhc adecuadas se describen en la Publicación de PCT N° WO/2017/143266.

Después de modificar las células T en el paso 130, la población de células T deficientes en HPRT se selecciona y/o expande (paso 140). En algunas realizaciones, el cultivo puede seleccionarse y expandir concurrentemente células con capacidad mejorada para el injerto (por ejemplo fenotipo de células madre T o de memoria central). En algunas realizaciones, el período de cultivo es menor de 14 días. En algunas realizaciones, el

período de cultivo es menor de 7 días.

En algunas realizaciones, el paso de seleccionar y expandir células comprende tratar la población de células T deficientes en HPRT ex vivo con un antimetabolito análogo de guanina (como 6-tioguanina (6TG), 6-mercaptopurina (6-MP) o azatioprina (AZA)). En algunas realizaciones, las células T se cultivan en presencia de 6-tioguanina ("6TG"), matando por tanto las células que no se han modificado en el paso 130. 6TG es un análogo de guanina que puede interferir con la biosíntesis de dGTP en la célula. El tio-dG puede incorporarse al ADN durante la replicación en lugar de la guanina y, cuando se incorpora, a menudo se metila. Esta metilación puede interferir con la reparación adecuada del apareamiento de ADN y puede dar como resultado la detención del ciclo celular y/o iniciar la apoptosis. 6TG se ha usado clínicamente para tratar a pacientes con ciertos tipos de enfermedades malignas debido a su toxicidad para las células que se dividen rápidamente. En presencia de 6TG, HPRT es la enzima responsable de la integración de 6TG en el ADN y el ARN en la célula, lo que da como resultado el bloqueo de la síntesis y el metabolismo adecuados de los polinucleótidos (ver la FIG. 7). Por otro lado, la vía de rescate está bloqueada en células deficientes en HPRT (ver la FIG. 7). Por tanto, las células usan la vía de novo para la síntesis de purinas (ver la FIG. 6). Sin embargo, en las células HPRT de tipo salvaje, las células usan la vía de recuperación y 6TG se convierte en 6TGMP en presencia de HPRT. 6TGMP se convierte por fosforilación en difosfato de tioguanina (TGDP) y trifosfato de tioguanina (TGTP). Simultáneamente se forman análogos de desoxirribosilo, a través de la enzima ribonucleótido reductasa. Como 6TG es altamente citotóxico, puede usarse como agente de selección para matar células con una enzima de HPRT funcional.

Las células deficientes en HPRT generadas luego se ponen en contacto con un análogo de purina ex vivo. Para el enfoque de silenciamiento, se cree que todavía puede haber HPRT residual en las células y que las células con silenciamiento de HPRT pueden tolerar una variedad de análogos de purina, pero se eliminarán con dosis/cantidades altas. En esta situación, la concentración de análogos de purina usados para la selección ex vivo varía de aproximadamente 10 nM a aproximadamente 5 µM. En algunas realizaciones, la concentración varía de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 2,5 µM. En otras realizaciones, la concentración varía de aproximadamente 200 nM a aproximadamente 2 µM. En otras realizaciones más, la concentración varía de aproximadamente 200 nM a aproximadamente 1 µM.

En otras realizaciones, la modificación de las células (por ejemplo, mediante el silenciamiento o desactivación de HPRT) puede ser lo suficientemente eficiente como para que no sea necesaria la selección ex vivo de las células deficientes en HPRT, es decir, no se requiere la selección con 6TG u otro compuesto similar.

En algunas realizaciones, las células deficientes en HPRT generadas se ponen en contacto tanto con un análogo de purina como con alopurinol, que es un inhibidor de la xantina oxidasa (XO). Inhibiendo la XO, hay más 6TG disponibles para ser metabolizados por HPRT. Cuando el 6TG es metabolizado por HPRT, forma 6TGN, que son los metabolitos tóxicos para las células (6TGN abarca 6-TG monofosfato (6TGMP), difosfato (6-TGDP) y trifosfato (6TGTP)). (ver la FIG. 14). (ver, por ejemplo, Curkovic et. al., Las dosis bajas de alopurinol son suficientes para optimizar la terapia con azatioprina en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal con concentraciones inadecuadas de metabolitos de tiopurina. *Eur J Clin Pharmacol.* Agosto 2013;69(8):1521-31; Gardiner et. al. El alopurinol podría mejorar la respuesta a la azatioprina y la 6-mercaptopurina mediante la corrección de una proporción desfavorable de metabolitos *J Gastroenterol Hepatol.* Enero 2011;26(1):49-54; Seinen et. al. El efecto de la terapia de combinación de alopurinol y tiopurina en dosis bajas sobre la actividad de tres enzimas fundamentales que metabolizan la tiopurina: resultados de un estudio farmacológico prospectivo *J Crohns Colitis.* Noviembre de 2013;7(10):812-9; y Wall et. al. Adición de alopurinol para alterar el metabolismo de la tiopurina para optimizar la terapia en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal. *Pharmacotherapy.* Febrero 2018;38(2):259-270).

En algunas realizaciones, se introduce alopurinol en las células deficientes en HPRT generadas antes de la introducción del análogo de purina. En otras realizaciones, se introduce alopurinol en las células deficientes en HPRT generadas simultáneamente con la introducción del análogo de purina. En otras realizaciones más, se introduce alopurinol en las células deficientes en HPRT generadas después de la introducción del análogo de purina.

Después de la selección y expansión, se prueba el producto de células T modificadas. En algunas realizaciones, el producto de células T modificadas se prueba de acuerdo con pruebas de liberación estándar (por ejemplo, actividad, micoplasma, viabilidad, estabilidad, fenotipo, etc.; ver *Molecular Therapy: Methods & Clinical Development* Vol. 4 Marzo 2017 92-101).

En otras realizaciones, se prueba la sensibilidad del producto de células T modificadas al MTX o al ácido micofenólico (MPA). Tanto el MTX como el MPA inhiben la síntesis de novo de purinas pero tienen diferentes mecanismos de acción. Se cree que el MTX inhibe competitivamente la dihidrofolato reductasa (DHFR), una enzima que participa en la síntesis del tetrahidrofolato (THF). DHFR cataliza la conversión de dihidrofolato a tetrahidrofolato activo. El ácido fólico es necesario para la síntesis de novo de la nucleósido timidina, requerida para la síntesis de ADN. Además, el folato es esencial para la biosíntesis de bases de purina y pirimidina, por lo que se inhibirá la síntesis. El ácido micofenólico (MPA) es un inhibidor potente, reversible y no competitivo de la inosina-5'-monofosfato deshidrogenasa (IMPDH), una enzima esencial para la síntesis de novo de guanina-5'-monofosfato

(GMP) a partir de inosina-5'-monofosfato (IMP).

MTX o MPA, por lo tanto, inhibe la síntesis de ADN, ARN, timidilatos y proteínas. MTX o MPA bloquean la vía de novo inhibiendo DHFR. En las células HPRT^{-/-}, no hay una vía de recuperación o de novo funcional, lo que lleva a la no síntesis de purina y, por lo tanto, las células mueren. Sin embargo, las células de tipo salvaje HPRT tienen una vía de recuperación funcional, tiene lugar su síntesis de purina y las células sobreviven. En algunas realizaciones, las células T modificadas son deficientes en HPRT. En algunas realizaciones, por lo menos el 85% de la población de células T modificadas es sensible a MTX o MPA. En otras realizaciones, por lo menos el 90% de la población de células T modificadas es sensible a MTX o MPA. En otras realizaciones más, por lo menos el 95% de la población de células T modificadas es sensible a MTX o MPA.

Dada la sensibilidad de las células T modificadas producidas de acuerdo con los pasos 110 a 140 a MTX o MPA, puede usarse MTX o MPA para eliminar selectivamente las células deficientes en HPRT, como se describe en la presente.

Tratamiento con células T modificadas

La composición que comprende los linfocitos deficientes en HPRT para su uso en un método para prevenir o mitigar la inmunodeficiencia posterior al trasplante (es decir, las células T modificadas preparadas de acuerdo con los pasos 110 a 140) se administra a un paciente (paso 150). En algunas realizaciones, las células T modificadas se proporcionan al paciente en una única administración (por ejemplo, un único bolo, o administración durante un período de tiempo establecido, por ejemplo, y una infusión durante aproximadamente de 1 a 4 horas o más). En otras realizaciones, se realizan múltiples administraciones de las células T modificadas. Si se administran múltiples dosis de células T modificadas, cada dosis puede ser igual o diferente (por ejemplo, dosis crecientes, dosis decrecientes).

En algunas realizaciones, la cantidad de la dosis de células T modificadas se determina en base al contenido de células T positivas para CD3/kg de peso corporal del sujeto. En algunas realizaciones, la dosis total de células T modificadas varía de aproximadamente $0,1 \times 10^6$ /kg de peso corporal a aproximadamente 730×10^6 /kg de peso corporal. En otras realizaciones, la dosis total de células T modificadas varía de aproximadamente 1×10^6 /kg de peso corporal a aproximadamente 500×10^6 /kg de peso corporal. En otras realizaciones más, la dosis total de células T modificadas varía de aproximadamente 1×10^6 /kg de peso corporal a aproximadamente 400×10^6 /kg de peso corporal. En realizaciones adicionales, la dosis total de células T modificadas varía de aproximadamente 1×10^6 /kg de peso corporal a aproximadamente 300×10^6 /kg de peso corporal. En otras realizaciones más, la dosis total de células T modificadas varía de aproximadamente 1×10^6 /kg de peso corporal a aproximadamente 200×10^6 /kg de peso corporal.

Cuando se proporcionan dosis múltiples, la frecuencia de dosificación puede variar de aproximadamente 1 semana a aproximadamente 36 semanas. De igual manera, cuando se proporcionan dosis múltiples, cada dosis de células T modificadas varía de aproximadamente $0,1 \times 10^6$ /kg de peso corporal a aproximadamente 240×10^6 /kg de peso corporal. En otras realizaciones, cada dosis de células T modificadas varía de aproximadamente $0,1 \times 10^6$ /kg de peso corporal a aproximadamente 180×10^6 /kg de peso corporal. En otras realizaciones, cada dosis de células T modificadas varía de aproximadamente $0,1 \times 10^6$ /kg de peso corporal a aproximadamente 140×10^6 /kg de peso corporal. En otras realizaciones, cada dosis de células T modificadas varía de aproximadamente $0,1 \times 10^6$ /kg de peso corporal a aproximadamente 100×10^6 /kg de peso corporal. En otras realizaciones, cada dosis de células T modificadas varía de aproximadamente $0,1 \times 10^6$ /kg de peso corporal a aproximadamente 60×10^6 /kg de peso corporal. Otras estrategias de dosificación se describen en Gozdzik J et al., Adoptive therapy with donor lymphocyte infusion after allogenic hematopoietic SCT in pediatric patients, Bone Marrow Transplant, Enero 2015;50(1):51-5).

Las células T modificadas pueden administrarse solas o como parte de una estrategia de tratamiento general. En algunas realizaciones, las células T modificadas se administran después de un trasplante de HSC, como de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 semanas después del trasplante de HSC. Por ejemplo, las células T modificadas se administran después de la administración de un trasplante de HSC para ayudar a prevenir o mitigar la inmunodeficiencia posterior al trasplante. Se cree que las células T modificadas pueden proporcionar una reconstitución y/o protección inmunitaria a corto plazo (por ejemplo, de aproximadamente 3 a aproximadamente 9 meses).

Supresión, control o mitigación de los efectos secundarios de la terapia con células T

La administración de células T a un paciente puede dar como resultado efectos secundarios no deseados, incluyendo los enumerados en la presente. Por ejemplo, la enfermedad de injerto contra huésped puede producirse después de que un paciente es tratado con células T, incluyendo las células T modificadas (por ejemplo, mediante silenciamiento o desactivación de HPRT). Después de la administración de las células T modificadas en el paso 150, se monitoriza al paciente para detectar la aparición de cualquier efecto secundario, que incluye pero no se limitan a, GVHD. Si apareciese algún efecto secundario, como GVHD (o síntomas de GVHD), se administra MTX o MPA al

paciente (in vivo) en el paso 160 para eliminar por lo menos una parte de las células T modificadas en un esfuerzo por suprimir, reducir, controlar o mitigar de otro modo los efectos secundarios, por ejemplo, GVHD. En algunas realizaciones, MTX o MPA se administran en una sola dosis. En otras realizaciones, se administran múltiples dosis de MTX y/o MPA.

Se cree que las células T modificadas de la presente divulgación (una vez seleccionadas para ex vivo y administradas al paciente o sujeto mamífero), pueden servir como un interruptor modulable de "encendido"/"apagado" dada su sensibilidad a MTX (o MPA). El interruptor modulable permite la regulación de la reconstitución del sistema inmunitario mediante la destrucción selectiva de por lo menos una parte de las células T modificadas in vivo mediante la administración de MTX al paciente en caso de que se produzcan efectos secundarios. Este interruptor modulable puede regularse adicionalmente administrando células T modificadas adicionales al paciente después de la administración de MTX para permitir una reconstitución del sistema inmunitario adicional después de que se hayan reducido o mitigado de otro modo los efectos secundarios. El experto en la técnica apreciará que cualquier profesional médico que supervise el tratamiento de un paciente puede equilibrar la reconstitución del sistema inmunitario a la vez que mantiene a raya los efectos secundarios o dentro de intervalos tolerables o aceptables. En virtud de lo anterior, puede mejorarse el tratamiento del paciente a la vez que se mitigan los efectos adversos.

En algunas realizaciones, la cantidad de MTX administrada varía de aproximadamente 2 mg/m²/infusión a aproximadamente 100 mg/m²/infusión. En algunas realizaciones, la cantidad de MTX administrada varía de aproximadamente 2 mg/m²/infusión a aproximadamente 90 mg/m²/infusión. En algunas realizaciones, la cantidad de MTX administrada varía de aproximadamente 2 mg/m²/infusión a aproximadamente 80 mg/m²/infusión. En algunas realizaciones, la cantidad de MTX administrada varía de aproximadamente 2 mg/m²/infusión a aproximadamente 70 mg/m²/infusión. En algunas realizaciones, la cantidad de MTX administrada varía de aproximadamente 2 mg/m²/infusión a aproximadamente 60 mg/m²/infusión. En algunas realizaciones, la cantidad de MTX administrada varía de aproximadamente 2 mg/m²/infusión a aproximadamente 50 mg/m²/infusión. En algunas realizaciones, la cantidad de MTX administrada varía de aproximadamente 2 mg/m²/infusión a aproximadamente 40 mg/m²/infusión. En algunas realizaciones, la cantidad de MTX administrada varía de aproximadamente 2 mg/m²/infusión a aproximadamente 30 mg/m²/infusión. En algunas realizaciones, la cantidad de MTX administrada varía de aproximadamente 20 mg/m²/infusión a aproximadamente 20 mg/m²/infusión. En algunas realizaciones, la cantidad de MTX administrada varía de aproximadamente 2 mg/m²/infusión a aproximadamente 10 mg/m²/infusión. En algunas realizaciones, la cantidad de MTX administrada varía de aproximadamente 2 mg/m²/infusión a aproximadamente 8 mg/m²/infusión. En otras realizaciones, la cantidad de MTX administrada varía de aproximadamente 2,5 mg/m²/infusión a aproximadamente 7,5 mg/m²/infusión. En otras realizaciones más, la cantidad de MTX administrada es de aproximadamente 5 mg/m²/infusión. En otras realizaciones más, la cantidad de MTX administrada es de aproximadamente 7,5 mg/m²/infusión.

En algunas realizaciones, se realizan entre 2 y 6 infusiones, y cada una de las infusiones puede comprender la misma dosificación o diferentes dosificaciones (por ejemplo, dosificaciones crecientes, dosificaciones decrecientes, etc.). En algunas realizaciones, las administraciones pueden realizarse semanalmente o bimensualmente.

En otras realizaciones más, la cantidad de MTX administrada se titula de tal manera que se resuelvan los efectos secundarios no controlados, por ejemplo, GVHD, a la vez que se conservan por lo menos algunas células T modificadas y sus efectos concomitantes en la reconstitución del sistema inmunitario. A este respecto, se cree que por lo menos algunos de los beneficios de las células T modificadas todavía pueden reconocerse mientras se mejoran los efectos secundarios, por ejemplo, la GVHD. En algunas realizaciones, las células T modificadas adicionales se administran después del tratamiento con MTX, es decir, después de la resolución, supresión o control de los efectos secundarios, por ejemplo, GVHD.

En algunas realizaciones, el sujeto recibe dosis de MTX antes de la administración de las células T modificadas, como para controlar o prevenir los efectos secundarios después del trasplante de HSC. En algunas realizaciones, el tratamiento existente con MTX se detiene antes de la administración de las células T modificadas y luego se reanuda, a la misma o diferente dosificación (y usando el mismo programa de dosificación o uno diferente), tras la aparición de los efectos secundarios después del tratamiento con el células T modificadas. A este respecto, los expertos en la técnica pueden administrar MTX según sea necesario y de acuerdo con los estándares de atención conocidos en la industria médica.

En algunas realizaciones, puede usarse un agente alternativo en lugar de MTX o MPA, incluyendo pero no limitados a, ribavarina (inhibidor de IMPDH); VX-497 (inhibidor de IMPDH) (ver Jain J, VX-497: a novel, selective IMPDH inhibitor and immunosuppressive agent, J Pharm Sci. Mayo 2001;90(5):625-37); lometexol (DDATHF, LY249543) (inhibidor de GAR y/o AICAR); análogo de tiofeno (LY254155) (inhibidor de GAR y/o AICAR), análogo de furano (LY222306) (inhibidor de GAR y/o AICAR) (ver Habeck et al., A Novel Class of Monoglutamated Antifolates Exhibits Tight-binding Inhibition of Human Glycinamide Ribonucleotide Formyltransferase and Potent Activity against Solid Tumors, Cancer Research 54, 1021-2026, Feb. 1994); DACTHF (inhibidor de GAR y/o AICAR) (ver Cheng et

al. Design, synthesis, and biological evaluation of 10-methanesulfonyl-DDACTHF, 10-methanesulfonyl-5-DACTHF, and 10-methylthio-DDACTHF as potent inhibitors of GAR Tfase and the de novo purine biosynthetic pathway; *Bioorg Med Chem.* Mayo 2005;13(10):3577-85); AG2034 (inhibidor de GAR y/o AICAR) (ver Boritzki et. al. AG2034: a novel inhibitor of glycinamide ribonucleotide formyltransferase, *Invest New Drugs.* 1996;14(3):295-303); LY309887 (inhibidor de GAR y/o AICAR) (ácido (2S)-2-[[[5-[2-[(6R)-2-amino-4-oxo-5,6,7,8-tetrahidro-1H-pirido[2,3-d]pirimidin-6-il]etil]tiofeno-2-carbonil]amino]pentanodioico); alimta (LY231514) (inhibidor de GAR y/o AICAR) (ver Shih et. Alabama. LY231514, a pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-based antifolate that inhibits multiple folate-requiring enzymes, *Cancer Res.* Marzo 1997 15;57(6):1116-23); dmAMT (inhibidor de GAR y/o AICAR), AG2009 (inhibidor de GAR y/o AICAR); forodesina (Immucilina H, BCX-1777; nombres comerciales Mundesine y Fodosine) (inhibidor de la fosforilasa del nucleósido de purina [PNP]) (ver Kicska et. al., Immucillin H, a powerful transition-state analog inhibitor of purine nucleoside phosphorylase, selectively inhibits human T lymphocytes, *PNAS* 10 de abril de 2001. 98 (8) 4593-4598); e immucilina-G (inhibidor de la purina nucleósido fosforilasa [PNP]).

Prevención de la inmunodeficiencia posterior al trasplante

Aunque el trasplante de células madre hematopoyéticas de hermanos compatibles con el antígeno leucocitario humano (HLA) se ha convertido en una modalidad de tratamiento estándar para muchas enfermedades hematológicas (malignas y no malignas), el trasplante alogénico de HSC (alo-HSCT) sigue siendo la única terapia curativa comprobada para la leucemia mieloide crónica. Las células madre hematopoyéticas pluripotentes requeridas para este procedimiento habitualmente se obtienen de la médula ósea o sangre periférica de un donante relacionado o no relacionado. Históricamente, los mejores resultados del HCT alogénico se han obtenido cuando el donante de células madre es un hermano HLA compatible. Sin embargo, cualquier par de hermanos dado tiene solo aproximadamente un 25% de posibilidades de heredar los mismos haplotipos de HLA de sus padres. Esto significa que solo aproximadamente el 30% de los pacientes tendrán tal compatibilidad. En consecuencia, la atención se ha centrado en otras fuentes de células madre. Para los pacientes que carecen de un hermano con HLA compatible, las fuentes alternativas de injertos de donantes incluyen donantes adultos no emparentados con HLA compatible adecuado, células madre de sangre del cordón umbilical y donantes relacionados con HLA parcialmente no coincidente o HLA haploidéntico. La decisión de qué fuente de donante utilizar depende, en gran medida, de la situación clínica y de los enfoques empleados en el centro de trasplante individual. Sin embargo, se cree que casi todos los pacientes tienen por lo menos un miembro de la familia (padre, hijo o hermano) no coincidente HLA-haploidéntico, que está inmediatamente disponible como donante.

El principal desafío del HSCT con HLA haploidéntico es la intensa alorreactividad bidireccional que lleva a una alta incidencia de rechazo del injerto y GVHD. Los avances en la manipulación de injertos y en la profilaxis farmacológica de la GVHD han reducido los riesgos de fallo de injerto y GVHD después de HCT con HLA-haploidéntico, y han hecho esta fuente de células madre una alternativa viable para pacientes que carecen de un hermano coincidente en HLA. Sin embargo, se cree que ambos enfoques pueden llevar a períodos de inmunodeficiencia después del trasplante, lo que hace que el receptor sea susceptible a la infección, que es la principal causa de mortalidad no relacionada con el fracaso del injerto. Se cree que los linfocitos del donante pueden desempeñar un papel terapéutico central en la inducción de la reconstitución inmunitaria, especialmente en el subconjunto de trasplantes compatibles con células T agotadas y en el contexto de trasplantes parcialmente incompatibles. De hecho, se cree que DLI puede usarse después del trasplante de células madre para prevenir o mitigar infecciones y para establecer el quimerismo total del donante. La adición de células T maduras que muestran un amplio repertorio de inmunidad de células T contra virus, hongos y otras infecciones oportunistas podría proporcionar un beneficio clínico (ver, por ejemplo, Loren AW, Porter DL. Donor leukocyte infusions after unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Oncol.* marzo de 2006;18(2):107-14; y Zhou X, et al. Long-term outcome after haploidentical stem cell transplant and infusion of T-cells expressing the inducible caspase 9 safety transgene. *Blood.* junio de 2014 19;123(25):3895-905).

Como se indica en la presente, la GVHD puede producirse después de que un paciente sea tratado con un trasplante de células madre. Para combatir esto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende linfocitos deficientes en HPRT para su uso en un método para prevenir o mitigar la inmunodeficiencia posterior al trasplante y un enfoque farmacológico para reducir, suprimir o controlar la GVHD en caso de que aparezca. Se cree que el enfoque divulgado se integra con la práctica de HSCT HLA-haploidéntico descrita anteriormente. En algunas realizaciones, el método utiliza una infusión de células T modificadas deficientes en HPRT en pacientes después de un HSCT alogénico para acelerar la reconstitución inmunitaria y proporcionar por lo menos algo de inmunidad para el huésped a la vez que al mismo tiempo se puede suprimir o controlar la GVHD mediante la dosificación con MTX.

La FIG. 2 ilustra un método para reducir, suprimir o controlar la GVHD tras la aparición de los síntomas. Inicialmente, las células se recogen de un donante en el paso 210. Las células pueden recogerse del mismo donante que proporcionó las HSC para el injerto (ver el paso 260) o de un donante diferente. Luego, los linfocitos se aíslan de las células recogidas (paso 220) y se tratan de tal manera que se vuelvan deficientes en HPRT (paso 230). Los métodos para tratar las células aisladas se exponen en la presente. Para llegar a una población de células T modificadas que son deficientes en HPRT, las células tratadas se seleccionan positivamente y se expanden (paso

240), tal como se describe en la presente. Luego, las células T modificadas se almacenan para su uso posterior.

Antes de recibir el injerto de HSC (paso 260), los pacientes se tratan con acondicionamiento mieloablatoivo según el estándar de atención (paso 250) (por ejemplo, dosis altas de radiación de acondicionamiento, quimioterapia y/o tratamiento con un análogo de purina; o dosis bajas de radiación de acondicionamiento, quimioterapia y/o tratamiento con un análogo de purina).

En algunas realizaciones, el paciente se trata con el injerto de HSC (paso 260) entre aproximadamente 24 y aproximadamente 96 horas después del tratamiento con el régimen de acondicionamiento. En otras realizaciones, el paciente se trata con el injerto de HSC entre aproximadamente 24 y aproximadamente 72 horas después del tratamiento con el régimen de acondicionamiento. En otras realizaciones más, el paciente se trata con el injerto de HSC entre aproximadamente 24 y aproximadamente 48 horas después del tratamiento con el régimen de acondicionamiento. En algunas realizaciones, el injerto de HSC comprende un mínimo de 2×10^6 células CD34+/kg, con un objetivo de más de 6×10^6 células CD34+/kg.

Después del injerto de HSC, las células T modificadas del paso 240 se administran al paciente de acuerdo con los protocolos de transfusión estándar (paso 270). En algunas realizaciones, las células T modificadas se administran entre aproximadamente 2 y aproximadamente 8 semanas después del injerto de HSC. En otras realizaciones, las células T modificadas se administran entre aproximadamente 2 y aproximadamente 6 semanas después del injerto de HSC. En otras realizaciones más, las células T modificadas se administran entre aproximadamente 2 y aproximadamente 4 semanas después del injerto de HSC. En algunas realizaciones, las células T modificadas se administran entre aproximadamente 1 día y aproximadamente 21 días después del injerto de HSC. En algunas realizaciones, las células T modificadas se administran entre aproximadamente 1 día y aproximadamente 14 días después del injerto de HSC. En algunas realizaciones, las células T modificadas se administran entre aproximadamente 1 día y aproximadamente 7 días después del injerto de HSC. En algunas realizaciones, las células T modificadas se administran entre aproximadamente 2 días y aproximadamente 4 días después del injerto de HSC. En algunas realizaciones, las células T modificadas se administran al mismo tiempo que el injerto de HSC o en el plazo de unas pocas horas del injerto de HSC (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 horas después del injerto de HSC).

Las células T modificadas pueden transfundirse en una sola administración. Alternativamente, las células T modificadas pueden transfundirse en el curso de múltiples administraciones. En realizaciones en las que se realizan administraciones múltiples de células T modificadas, se pueden transfundir cantidades iguales o diferentes de células T modificadas en cada administración, tal como se describe en la presente.

Después de la administración de las células T modificadas, se monitoriza al paciente para detectar la aparición de GVHD. Si aparecen síntomas, puede administrarse MTX (paso 280) para revertir, suprimir o controlar la GVHD. El MTX puede administrarse en una única dosis o en múltiples dosis. Si se realizan múltiples administraciones de MTX, la dosis puede ajustarse para equilibrar la GVHD a la vez que se mantienen algunas de las protecciones otorgadas al sistema inmunitario por las células T modificadas.

En algunas realizaciones, la cantidad de MTX administrada varía de aproximadamente 2 mg/m²/infusión y aproximadamente 100 mg/m²/infusión. En algunas realizaciones, la cantidad de MTX administrada varía de aproximadamente 2 mg/m²/infusión a aproximadamente 90 mg/m²/infusión. En algunas realizaciones, la cantidad de MTX administrada varía de aproximadamente 2 mg/m²/infusión a aproximadamente 80 mg/m²/infusión. En algunas realizaciones, la cantidad de MTX administrada varía de aproximadamente 2 mg/m²/infusión a aproximadamente 70 mg/m²/infusión. En algunas realizaciones, la cantidad de MTX administrada varía de aproximadamente 2 mg/m²/infusión a aproximadamente 60 mg/m²/infusión. En algunas realizaciones, la cantidad de MTX administrada varía de aproximadamente 2 mg/m²/infusión a aproximadamente 50 mg/m²/infusión. En algunas realizaciones, la cantidad de MTX administrada varía de aproximadamente 2 mg/m²/infusión a aproximadamente 40 mg/m²/infusión. En algunas realizaciones, la cantidad de MTX administrada varía de aproximadamente 2 mg/m²/infusión a aproximadamente 30 mg/m²/infusión. En algunas realizaciones, la cantidad de MTX administrada varía de aproximadamente 20 mg/m²/infusión a aproximadamente 20 mg/m²/infusión. En algunas realizaciones, la cantidad de MTX administrada varía de aproximadamente 2 mg/m²/infusión a aproximadamente 10 mg/m²/infusión. En algunas realizaciones, la cantidad de MTX administrada varía de aproximadamente 2 mg/m²/infusión a aproximadamente 8 mg/m²/infusión. En otras realizaciones, la cantidad de MTX administrada varía de aproximadamente 2,5 mg/m²/infusión a aproximadamente 7,5 mg/m²/infusión. En otras realizaciones más, la cantidad de MTX administrada es de aproximadamente 5 mg/m²/infusión. En otras realizaciones más, la cantidad de MTX administrada es de aproximadamente 7,5 mg/m²/infusión.

En algunas realizaciones, se realizan entre 2 y 6 infusiones, y cada una de las infusiones puede comprender la misma dosificación o diferentes dosificaciones (por ejemplo, dosificaciones crecientes, dosificaciones decrecientes, etc.). En otras realizaciones se realizan entre 2 y 4 infusiones. En algunas realizaciones, las administraciones pueden realizarse semanalmente o bimensualmente.

EJEMPLOS**Ejemplo 1 (por referencia)**

5 Las células CAR-T se producen al infectar las células con el constructo CAR junto con el ARNhc para HPRT. Esto está en un único vector lentiviral con CAR y ARNhc impulsados por diferentes promotores (Pol II y Pol III respectivamente). Se cree que si el ARNhc dirigido a HPRT está dentro de un marco de ARNmi, también podría expresarse a partir de un promotor Pol II (quizás incluso el mismo promotor).

10 Luego, las células CAR-T shHPRT transducidas se infunden en un paciente leucémico y se monitoriza la respuesta antileucémica mientras, si es necesario, se expanden las células CAR-T shHPRT con 6TG. Una vez que el efecto está impactando, puede contemplarse una estrategia de apagado que usa metotrexato para matar las células CAR-T shHPRT transducidas. Esta estrategia de eliminación se implementa si se observa una respuesta inflamatoria o una proliferación clonal indebida de las células CAR-T shHPRT. Cabe señalar que algunos antígenos antileucémicos también están presentes en las células sanas normales y pueden tener un efecto adverso. Por tanto, la aplicación de esta estrategia de selección/suicidio aumenta el perfil de eficacia/seguridad.

Ejemplo 2 (por referencia)

20 En el trasplante alogénico de médula ósea por enfermedad maligna hematológica, las células T del donante se incluyen con el trasplante de médula ósea para lograr un efecto antitumoral. Esto es importante para eliminar la enfermedad residual después del acondicionamiento previo al trasplante. En este ejemplo, las células T del donante se transducen con un vector lentiviral que contiene ARNhc a HPRT antes de la infusión y, una vez infundidas, se evalúa el impacto de las células T del donante. Como se monitoriza el efecto de injerto contra leucemia (GVL), si hay una enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) consecuente, esto puede mejorarse usando el interruptor "matar" con metotrexato. Esto permite GVL sin la GVHD consecuente.

Ejemplo 3

30 En el trasplante alogénico de médula ósea, hay una recuperación inmunitaria retardada con riesgo de infección por agentes adventicios. Para protegerse contra esto y mantener la actividad de las células T, se administran células T de donantes transducidas con un vector lentiviral que contiene HPRT. Con el tiempo, esto proporcionará un control auxiliar sobre posibles infecciones hasta que las células T derivadas de las células madre trasplantadas de médula ósea reconstituyan el sistema hematopoyético. Si hay una respuesta inflamatoria adversa o cualquier otro EA relacionado con las células T del donante, se eliminan con metotrexato. Esto permite el control inmunitario antiinfección sin GVHD.

Ejemplo 4 (por referencia)

40 Un paciente tiene una leucemia. Se recogen sus propias células T alogénicas o coincidentes y se cultivan en cultivo de tejidos con citoquinas que apoyan el crecimiento, por ejemplo, IL2 o IL7, tiempo durante el cual se transducen (infectan lo que lleva a la expresión transgénica) con un vector lentiviral autoinactivante que contiene tres elementos, es decir direccionamiento de tumores, maquinaria de lisis celular y un vector que incluye componentes para silenciar HPRT. Estas células modificadas genéticamente de 1×10^6 a 2×10^8 células/metro cuadrado se infunden en el paciente después de una dosis de Cytoxan IV, por ejemplo, a 500 mg/metro cuadrado IV (para hacer espacio para las células CAR-T introducidas). En este ejemplo, las células CAR-T modificadas genéticamente tienen algún efecto sobre la leucemia. La carga de células leucémicas se monitoriza, por ejemplo, mediante recuentos sanguíneos diferenciales, y si el médico desea que se eliminen más células tumorales, se administran 0,4 mg/kg de 6TG al paciente por vía IV para aumentar el número relativo de células CAR-T dirigidas al tumor seleccionando estas células. Si las células CAR-T ejercen su efecto antileucémico positivo pero hay una "sobreactivación" que lleva a, por ejemplo, una tormenta de citoquinas inflamatorias, entonces puede producirse lo contrario, en donde las células CAR-T se eliminan mediante una infusión IV de metotrexato, por ejemplo, a una dosis total de 100 mg.

Ejemplo 5 - Silenciamiento frente a desactivación de HPRT con selección de 6TG

55 Las células K562 se transdujeron con un vector que incluía una secuencia de ácidos nucleico diseñada para silenciar HPRT y una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína fluorescente verde (GFP) (MOI = 1/2/5); o se transfectaron con una nanocápsula que incluía CRISPR/Cas9 y un ARNsg para HPRT (100 ng/5x10⁴ células) el día cero (0). Se añadió 6-TG al medio desde el día 3 hasta el día 14. El medio se renovó cada 3 o 4 días. 60 La GFP se analizó en una máquina de flujo y el% de InDel se analizó con el ensayo T7E1. La FIG. 9A ilustra que la población GFP+ de células K562 transducidas aumentó desde el día 3 hasta el día 14 bajo tratamiento con 6TG; mientras que la población GFP+ se mantuvo casi estable sin tratamiento con 6-TG. La FIG. 9B ilustra que la población de células K562 desactivadas por HPRT aumentó del día 3 al 14 bajo el tratamiento con 6TG y dosis más altas (900 nM) de 6TG llevaron a una selección más rápida en comparación con una dosificación de 300/600 nM de 6TG. Cabe señalar que el proceso de selección de 6TG se produjo mucho más rápido en las 65

células con desactivación de HPRT en comparación con las células con silenciamiento de HPRT (MOI=1) a la misma concentración de 300 nM de 6TG desde el día 3 hasta el día 14. La diferencia entre silenciamiento y desactivación podría explicarse por cierto nivel de HPRT residual por el enfoque de silenciamiento de ARNi en comparación con la eliminación total de HPRT por el enfoque de desactivación. Por lo tanto, se creía que las células con desactivación de HPRT tenían una tolerancia mucho mayor frente a 6TG y que crecían mucho más rápido con dosificaciones más altas de 6TG (900 nM) en comparación con las células con silenciamiento de HPRT.

Se transdujeron células CEM con un vector que incluía una secuencia de ácidos nucleicos diseñada para silenciar HPRT y una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína verde fluorescente o se transfectaron con una nanocápsula que incluía CRISPR/Cas9 y un ARNsg para HPRT en el día 0. Se añadió 6-TG al medio desde el día 3 hasta el día 17. El medio se renovó cada 3 a 4 días. GFP se analizó en una máquina de flujo y el % de InDel se analizó mediante ensayo T7E1. La FIG. 10 A ilustra que la población de GFP+ de células K562 transducidas aumentó desde el día 3 hasta el día 17 bajo tratamiento con 6TG mientras que la población de GFP+ fue casi estable sin 6-TG. La FIG. 10B muestra que la población de células CEM inactivadas por HPRT aumentó desde el día 3 al 17 bajo el tratamiento con 6TG y que una dosificación más alta (900 nM) de 6TG lleva a una selección más rápida en comparación con una dosis de 300/600 nM de 6TG. Cabe señalar que el proceso de selección de 6TG se produjo más rápido en las células con desactivación de HPRT que en las células con silenciamiento de HPRT (MOI = 1) a la misma concentración de 6TG desde el día 3 hasta el día 17.

Ejemplo 6 - Selección negativa con MTX o MPA

Se cultivaron células K562 transducidas o transfectadas (como las del ejemplo 6) con o sin MTX desde el día 0 hasta el día 14. El medio se renovó cada 3 o 4 días. La GFP se analizó en una máquina de flujo y el % de InDel se analizó mediante el ensayo T7E1. La FIG. 11A muestra que la población de GFP- de células K562 transducidas disminuyó con el tratamiento de 0,3 μ M de MTX, la población de células se mantuvo estable sin MTX. La FIG. 11B ilustra que las células K562 transfectadas se eliminaron bajo tratamiento con 0,3 μ M de MTX a un ritmo más rápido en comparación con la población de HPRT-KD.

Se cultivaron células CEM transducidas o transfectadas (como las del ejemplo 6) con o sin MTX desde el día 0 hasta el día 14. El medio se renovó cada 3 a 4 días. La GFP se analizó en una máquina de flujo y el % de InDel se analizó mediante el ensayo T7E1. La FIG. 121A muestra que la población de GFP- de K562 transducidas disminuyó con el tratamiento de 1 μ M de MPA o 0,3 μ M de MTX o 10 μ M de MPA mientras que la población de células se mantuvo estable para el grupo no tratado. La FIG. 12B ilustra que la población de células CEM con desactivación de HPRT se eliminó a un ritmo más rápido con el tratamiento de 1 μ M de MPA o 0,3 μ M de MTX o 10 μ M de MPA.

Ejemplo 7 - Selección negativa con MTX para células K562

Las células K562 se transdujeron con sopa de virus TL20cw-GFP con un factor de dilución de 16, sopa de virus TL20cw-Ubc/GFP-7SK/sh734 (una que codifica secuencialmente GFP y un ARNhc diseñado para silenciar HPRT) con un factor de dilución de 16 y sopa de virus TL20cw-7SK/sh734-UBC/GFP (una que codifica secuencialmente un ARNhc diseñado para silenciar HPRT y GFP) con un factor de dilución de 16, respectivamente (ver la FIG. 13). Todas las células se cultivaron con medio que contenía 0,3 μ M de MTX 3 días después. También se muestran en la FIG. 13 células K562 que fueron transducidas por sopa de virus TL20cw-7SK/sh734-UBC/GFP (una que codifica un ácido nucleico que codifica un ARNhc diseñado para silenciar HPRT) con un factor de dilución de 1024 un mes antes y donde las células transducidas con GFP-sh734 fueron positivas seleccionado con 300 nM de 6TG. 6-TG fue seleccionado durante ese tiempo para llegar a más del 90% de la población GFP+. Como se ilustra en la FIG. 13, a partir de >90% de la población de GFP+, las células transducidas con GFP o GFP-sh734 no mostraron una reducción en la población de GFP+, mientras que las células transducidas con sh734-GFP a niveles de alta y baja dilución mostraron una desección de la población de GFP+. Se midió la expresión relativa de sh734 por VCN para células transducidas con sh734-GFP y células transducidas con GFP-sh73. Los resultados sugirieron que el metotrexato solo podía deseleccionar células transducidas con el vector lentiviral sh734 de alta expresión (TL20cw-7SK/sh734-UBC/GFP) y no con el vector lentiviral de baja expresión sh734 (TL20cw-UBC/GFP-7SK/sh734). Este ejemplo demostró que diferentes diseños de vectores (incluso aquellos que tenían el mismo ARNhc) tenían un impacto sobre la expresión de la horquilla de ARNhc y podían determinar si las células transducidas podían ser deseleccionadas o no por MTX.

DECLARACIÓN DE APLICABILIDAD INDUSTRIAL

La presente divulgación tiene aplicabilidad industrial en el campo de la medicina, por ejemplo, la terapia génica.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende linfocitos deficientes en HPRT para su uso en un método para prevenir o mitigar la inmunodeficiencia posterior al trasplante a la vez que se mitigan los efectos secundarios, el método comprendiendo:
- 10 (a) generar linfocitos deficientes en HPRT *ex vivo*;
 (b) seleccionar positivamente los linfocitos deficientes en HPRT *ex vivo* para proporcionar una población de linfocitos modificados, en donde los linfocitos deficientes en HPRT se generan a través del silenciamiento del gen de HPRT;
 (c) administrar la población de linfocitos modificados al paciente al mismo tiempo o después de la administración de un injerto de HSC alogénico; y
 (d) opcionalmente administrar MTX si aparecen efectos secundarios.
- 15 2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el silenciamiento del gen de HPRT comprende poner en contacto linfocitos con un vector lentiviral que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un ARNhc.
- 20 3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica el ARNhc se procesa intracelularmente para generar un dúplex de ARNip.
4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el ARNhc tiene por lo menos un 80% de identidad con la de la SEQ ID NO: 1.
- 25 5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el ARNhc tiene por lo menos un 90% de identidad con la de la SEQ ID NO: 1.
6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el ARNhc tiene por lo menos un 95% de identidad con la de la SEQ ID NO: 1.
- 30 7. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el dúplex de ARNip generado se deriva de un ARNhc que tiene la SEQ ID NO: 1.
- 35 8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la selección positiva comprende poner en contacto los linfocitos deficientes en HPRT generados con un análogo de purina, particularmente en donde el análogo de purina es 6TG, más particularmente 6TG en una cantidad de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 15 µg/ml.
- 40 9. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la selección positiva comprende poner en contacto los linfocitos deficientes en HPRT generados con un análogo de purina y un inhibidor de xantina oxidasa, en donde el inhibidor de xantina oxidasa es alopurinol.
- 45 10. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el injerto de HSC se administra al paciente después del acondicionamiento mieloablativo.
- 50 11. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los linfocitos modificados se formulan para su administración como un bolo único o múltiples dosis, en particular en donde cada dosis comprende entre aproximadamente $0,1 \times 10^6$ células/kg y aproximadamente 240×10^6 células/kg, en particular en donde la dosificación total de linfocitos modificados comprende entre aproximadamente $0,1 \times 10^6$ células/kg y aproximadamente 730×10^6 células/kg.
12. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la administración de los linfocitos modificados tiene lugar de 2 a 4 semanas después de la administración separada del injerto de HSC.
- 55 13. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el efecto secundario es GVHD
- 60 14. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el MTX se administra en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 2 mg/m²/infusión a aproximadamente 100 mg/m²/infusión, particularmente de aproximadamente 2 mg/m² /infusión a aproximadamente 8 mg/m²/infusión.

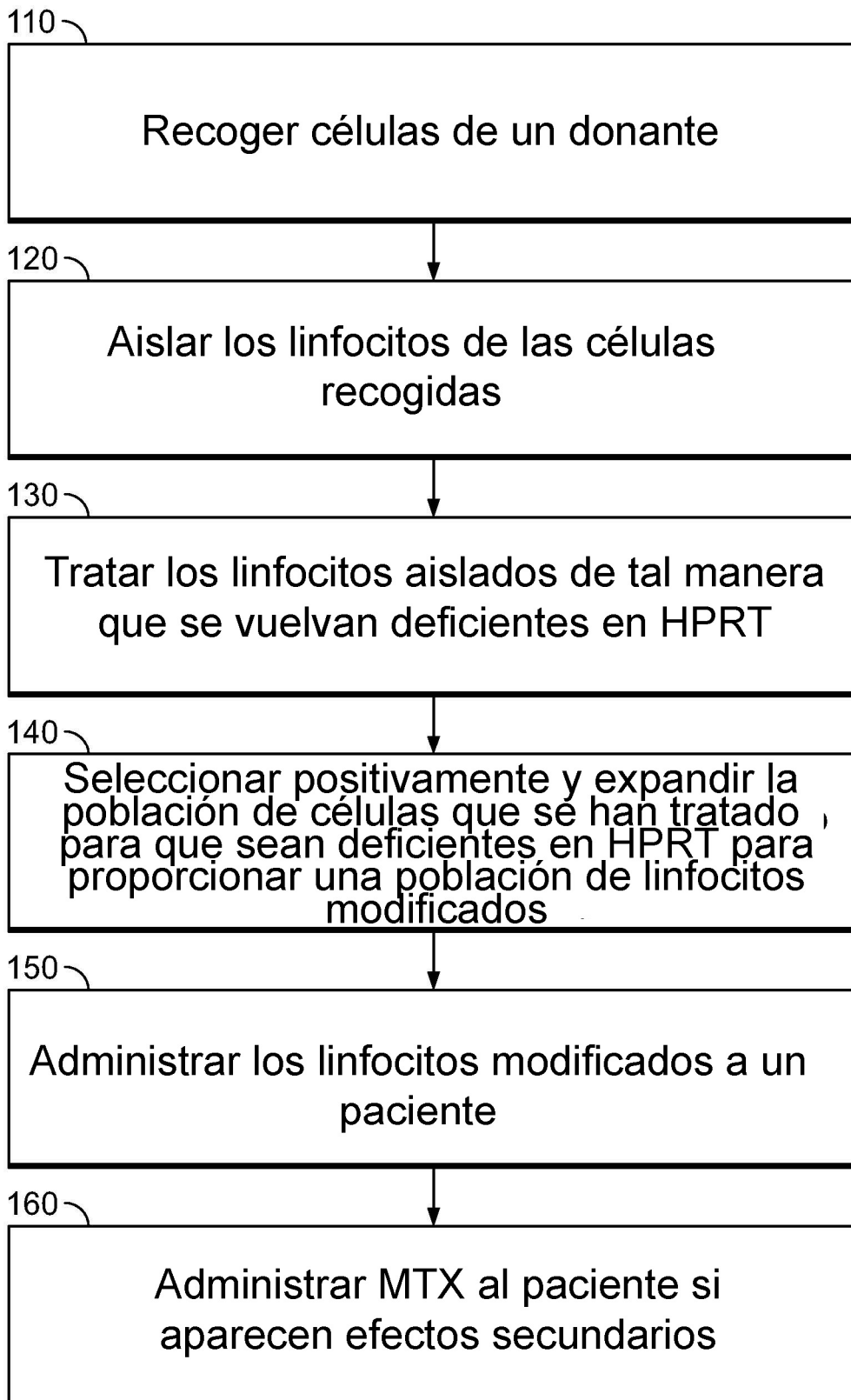


FIG. 1

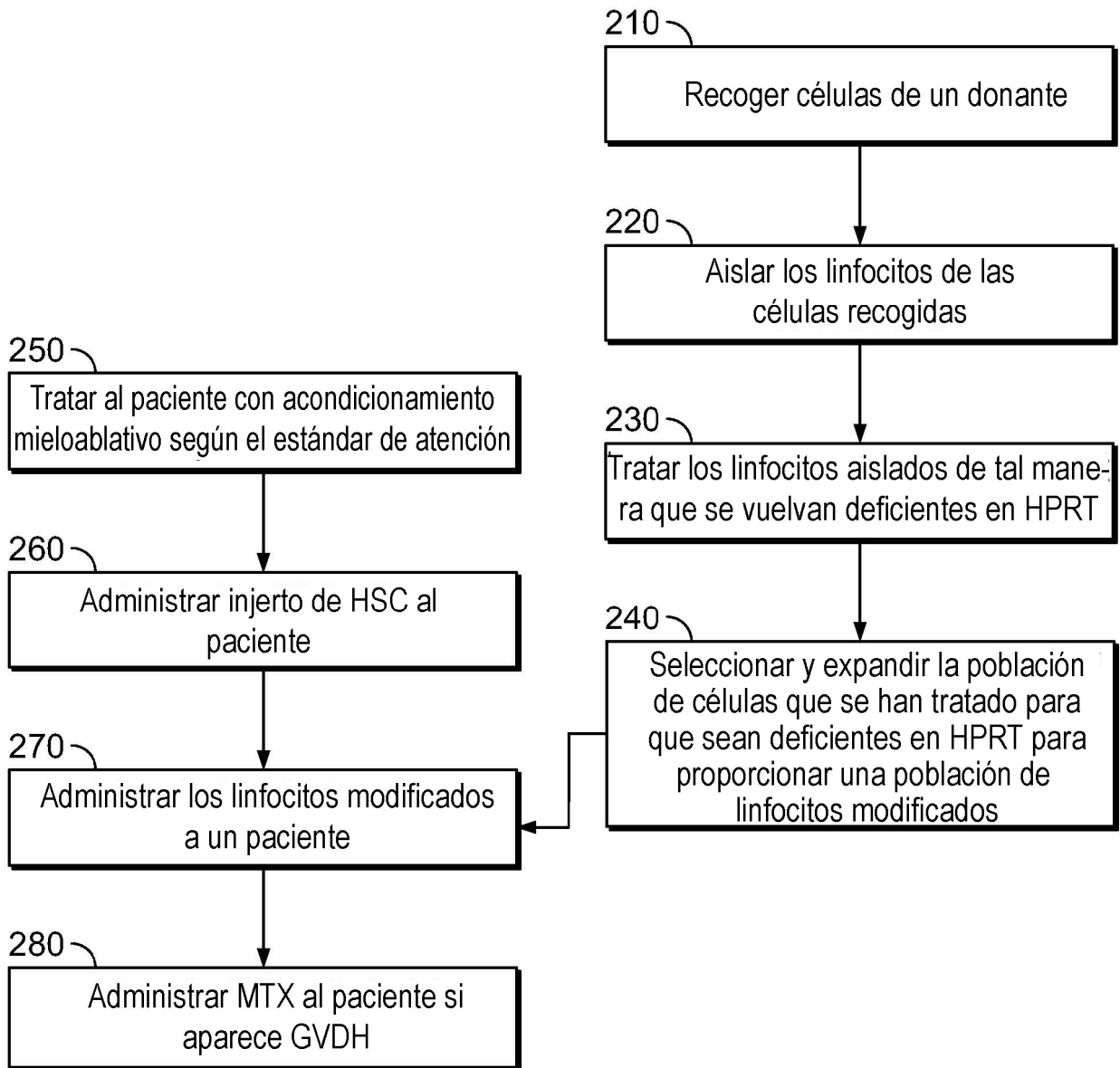


FIG. 2

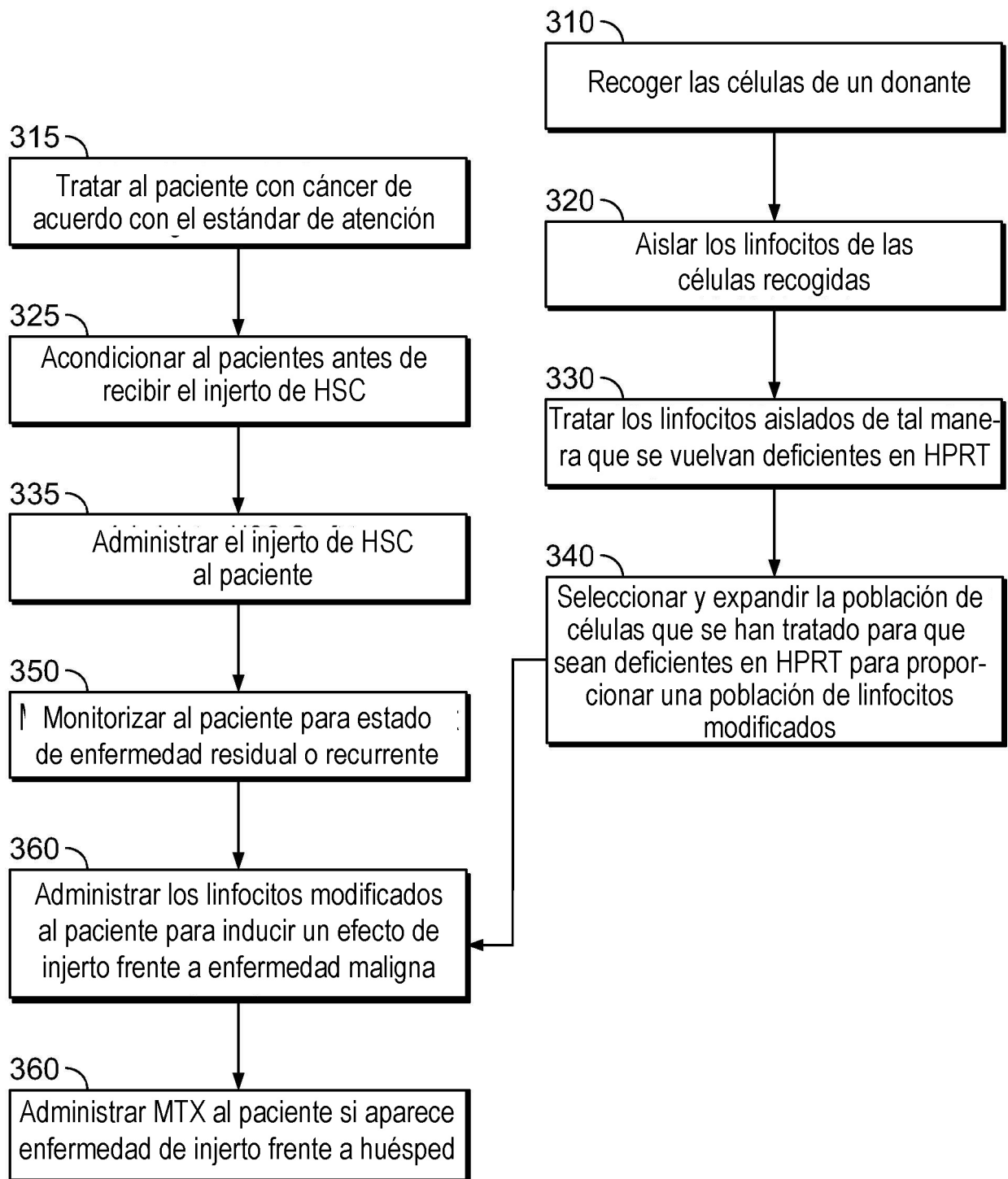


FIG. 3

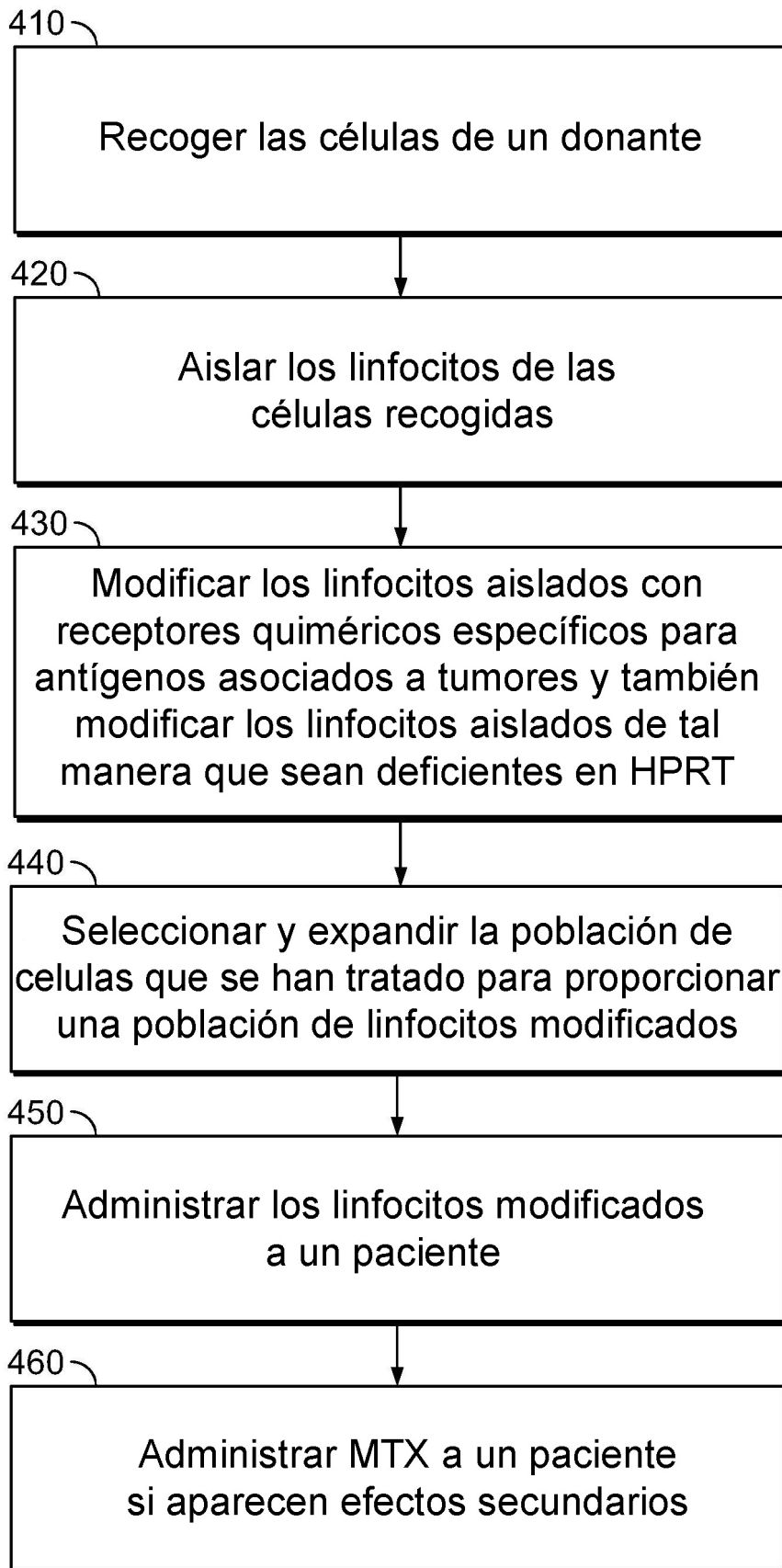


FIG. 4

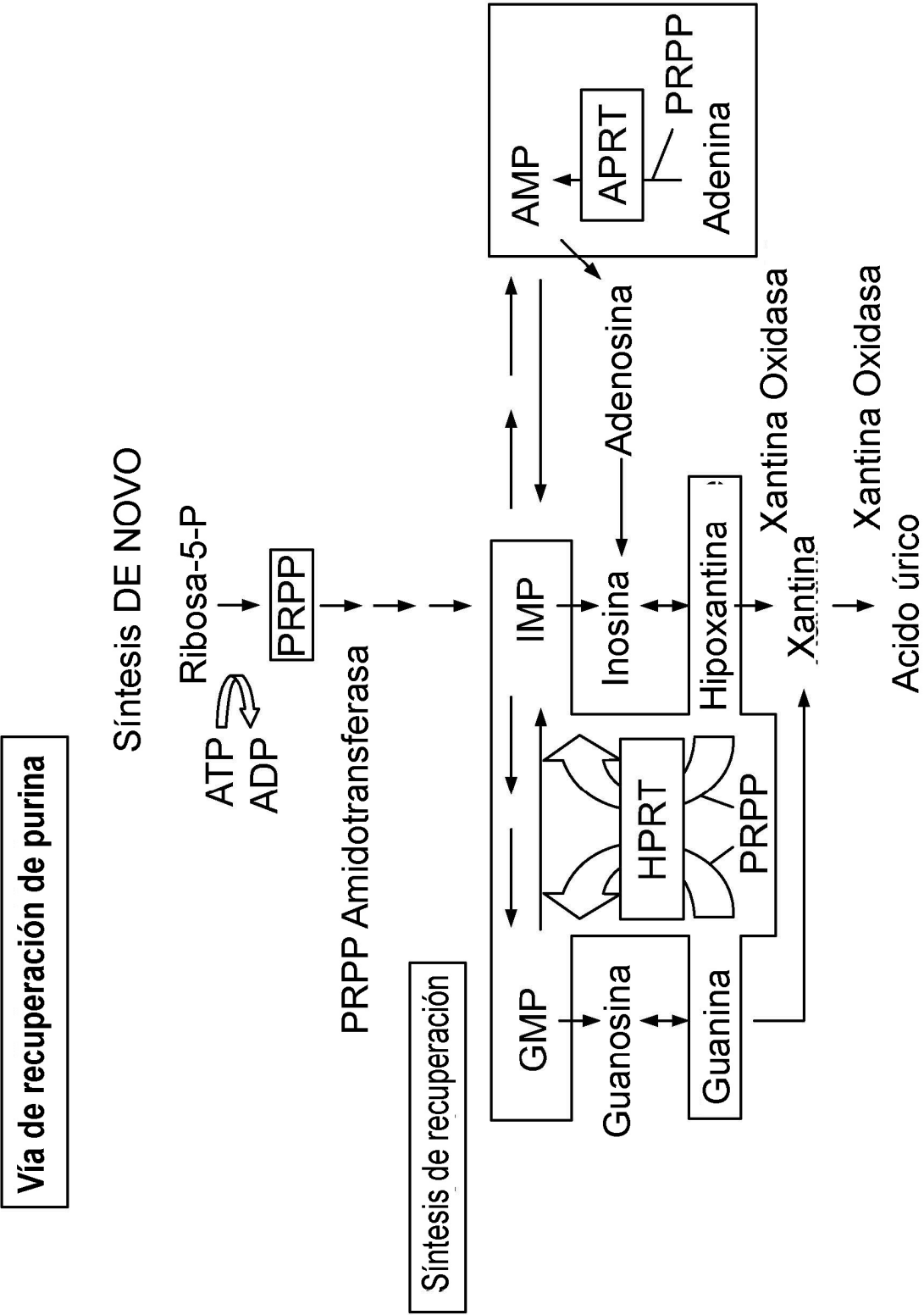


FIG. 5

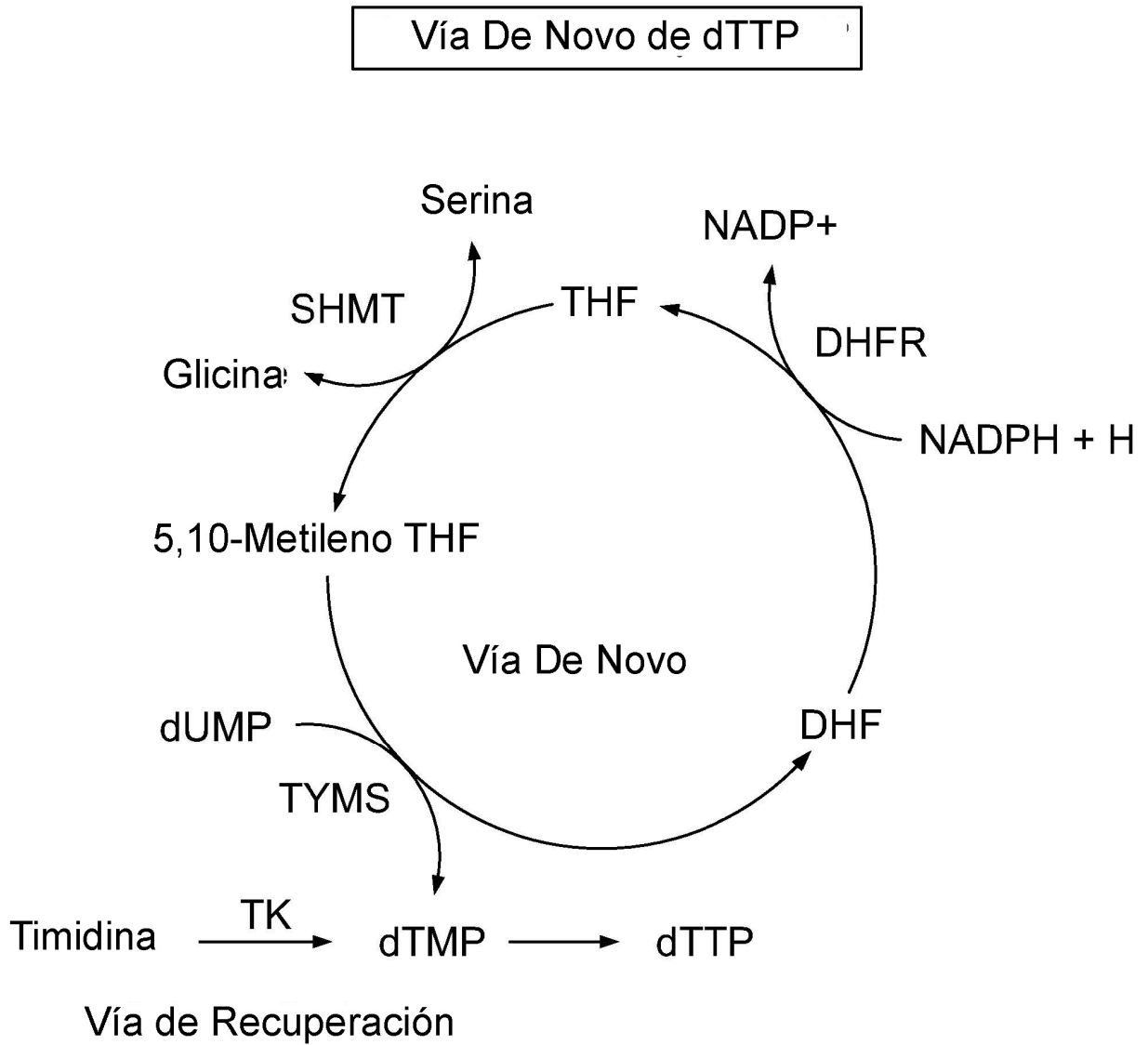


FIG. 6

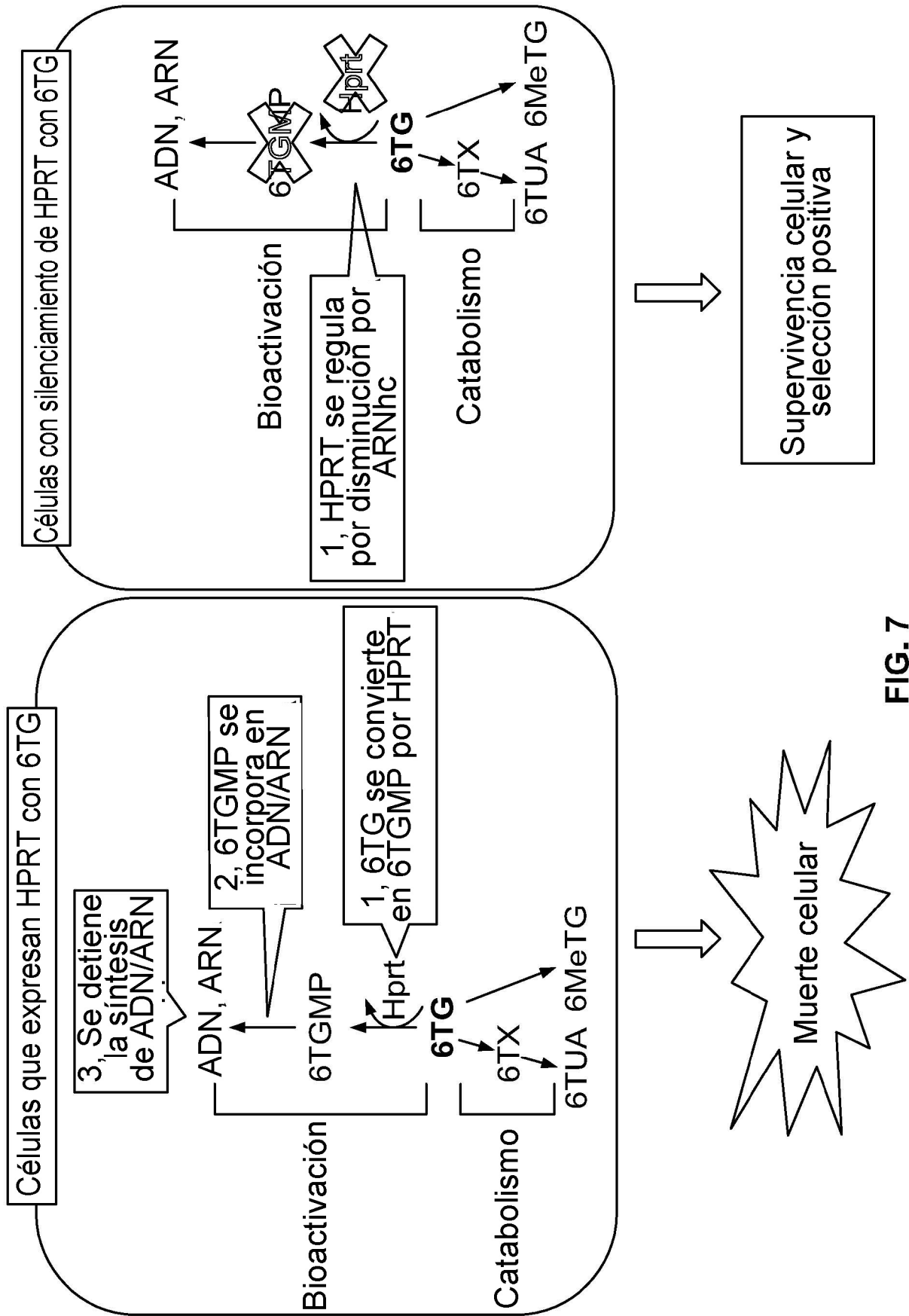


FIG. 7



FIG. 8

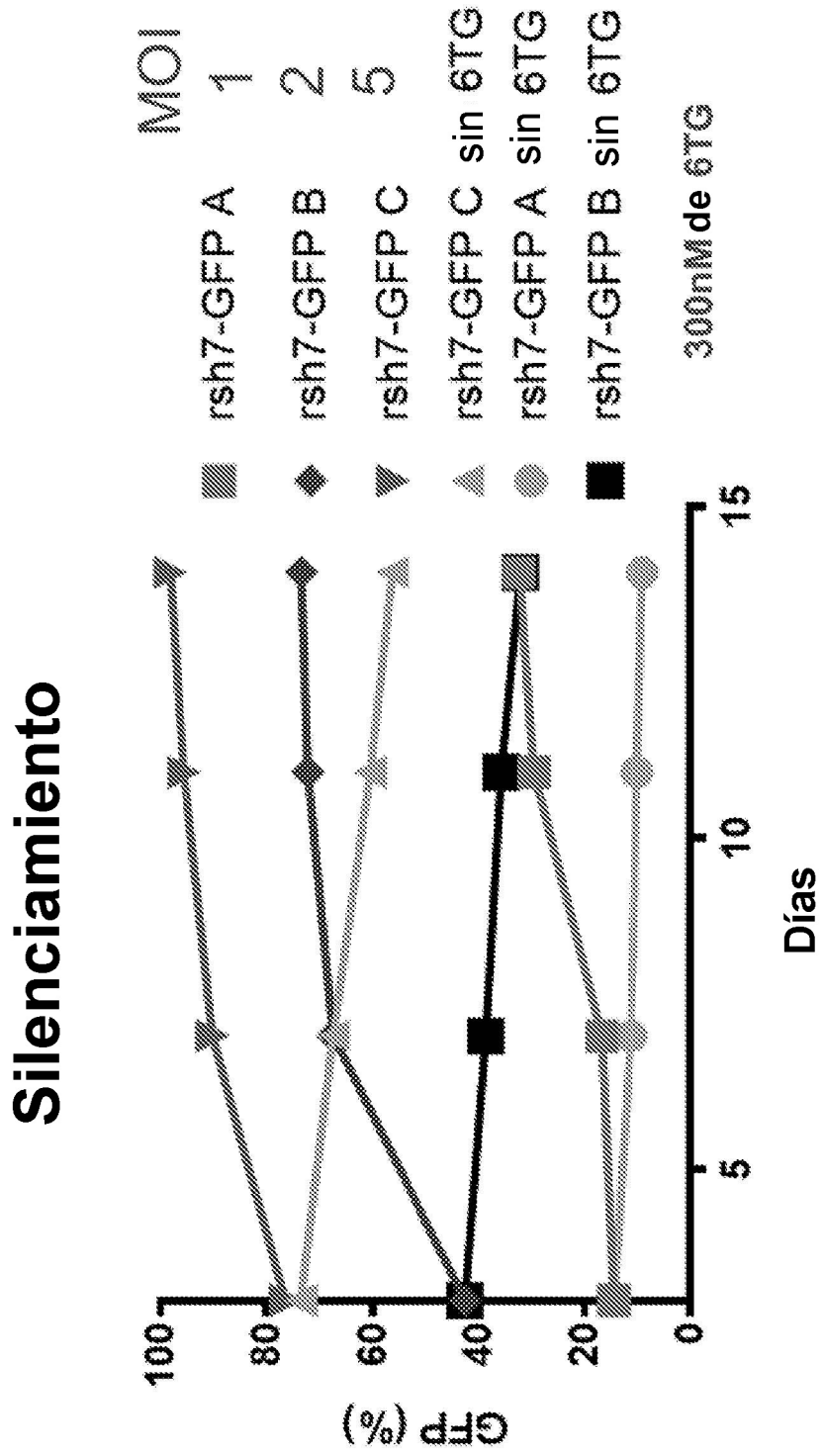


FIG. 9A

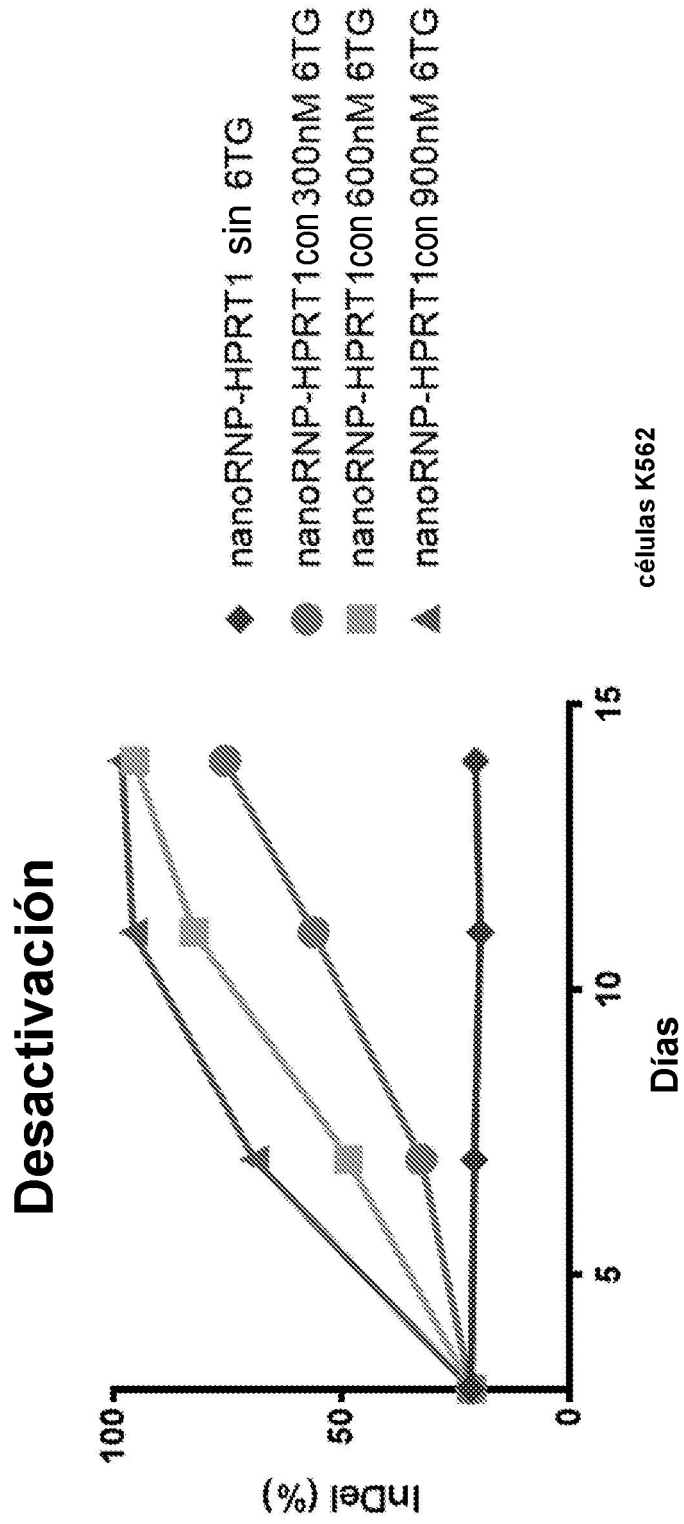


FIG. 9B

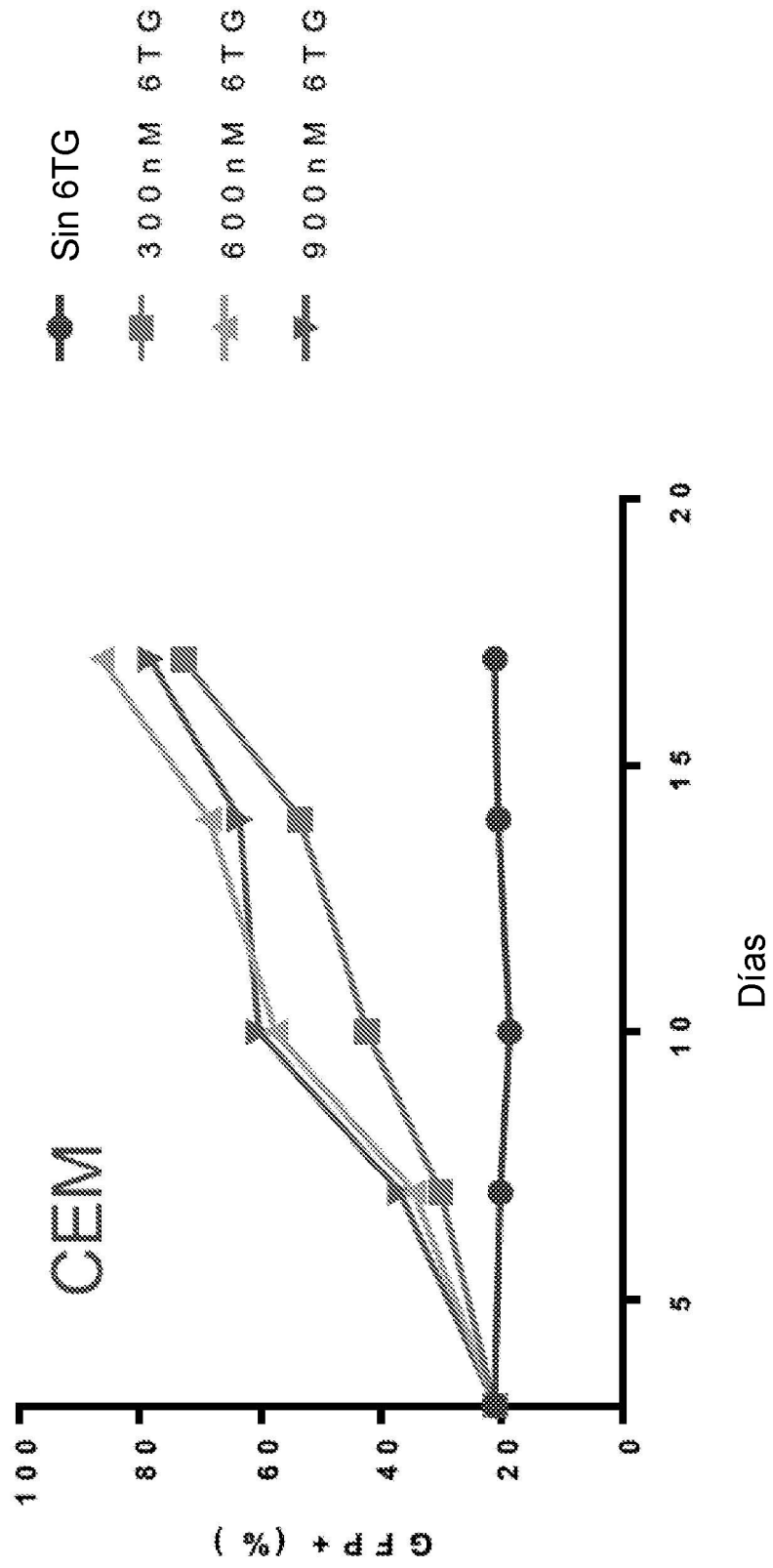


FIG. 10A

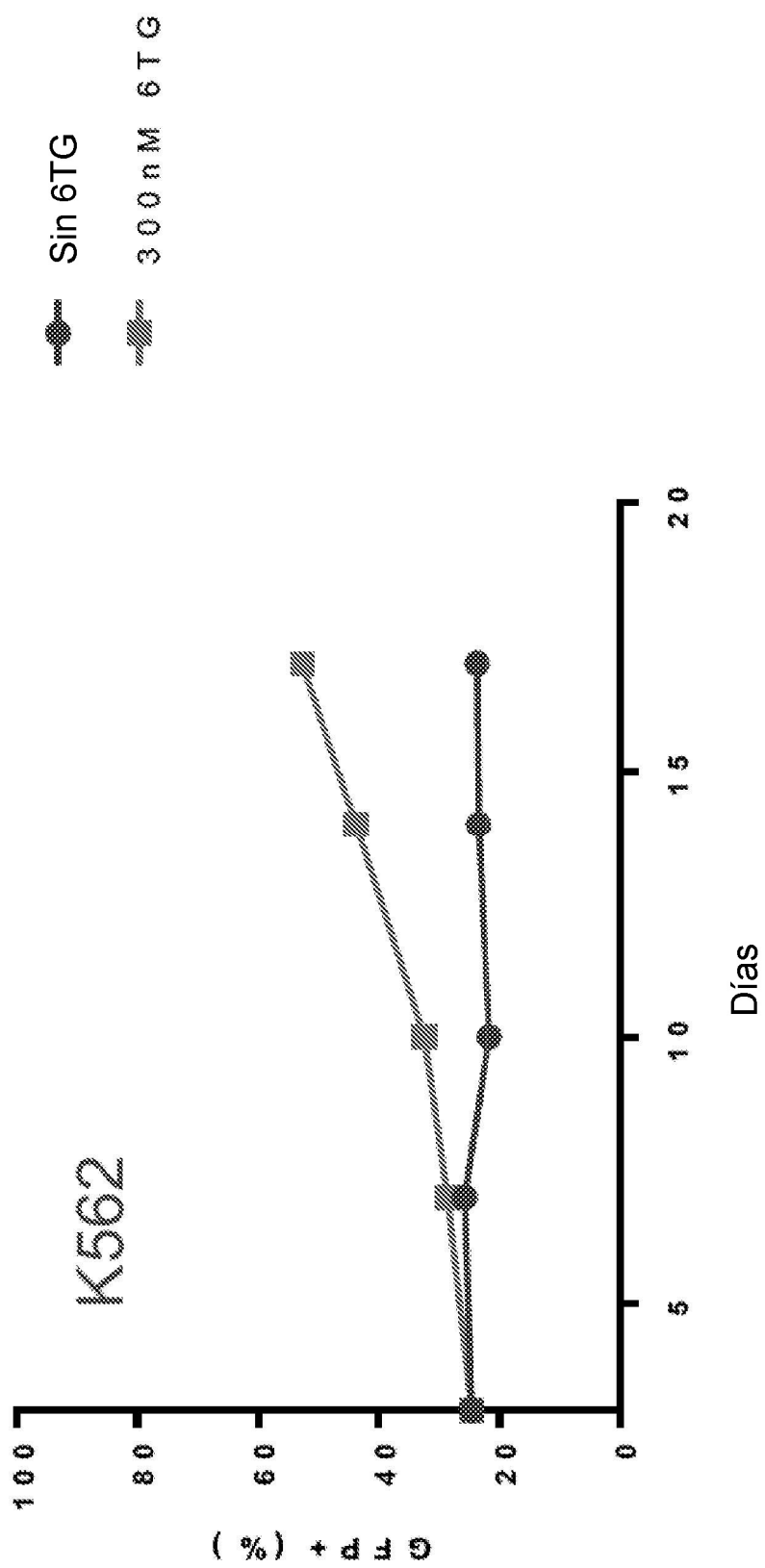


FIG. 10B

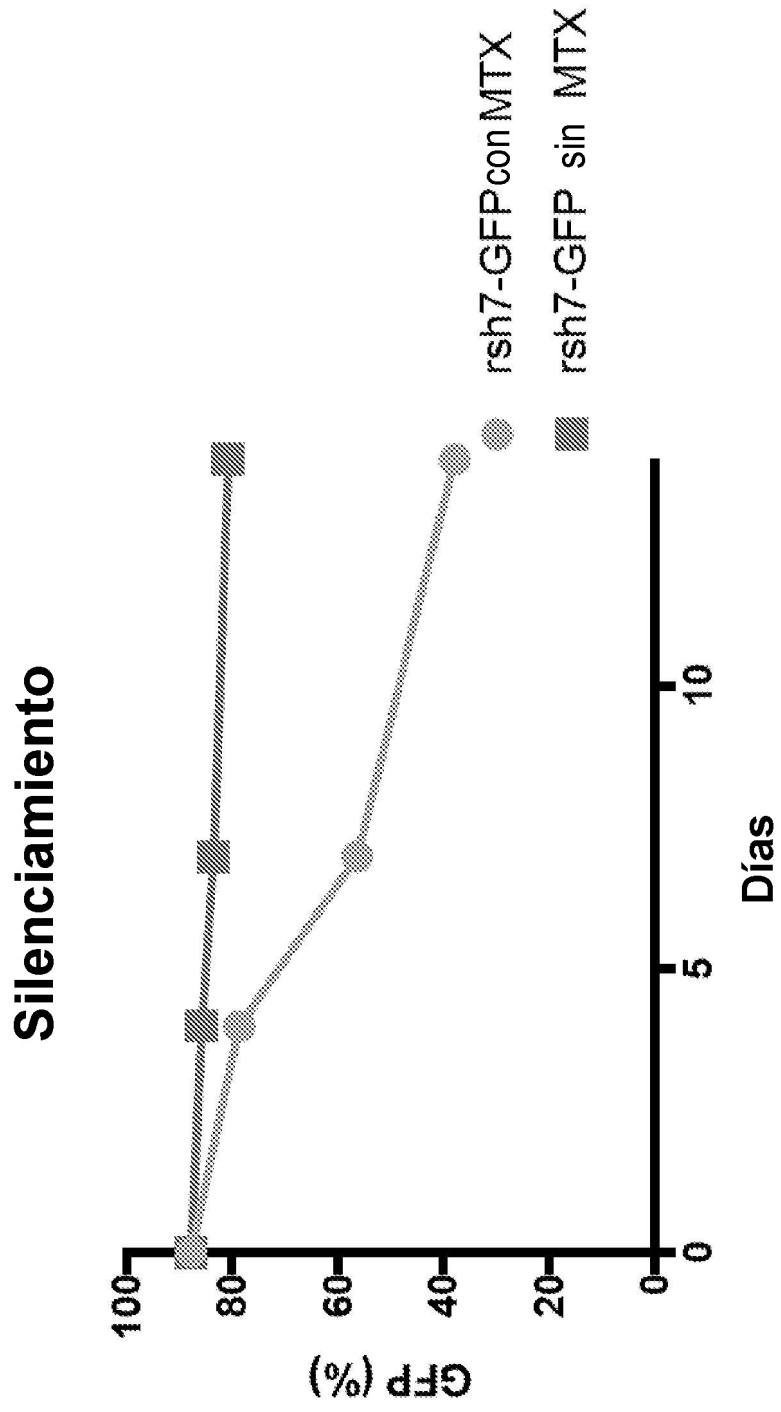
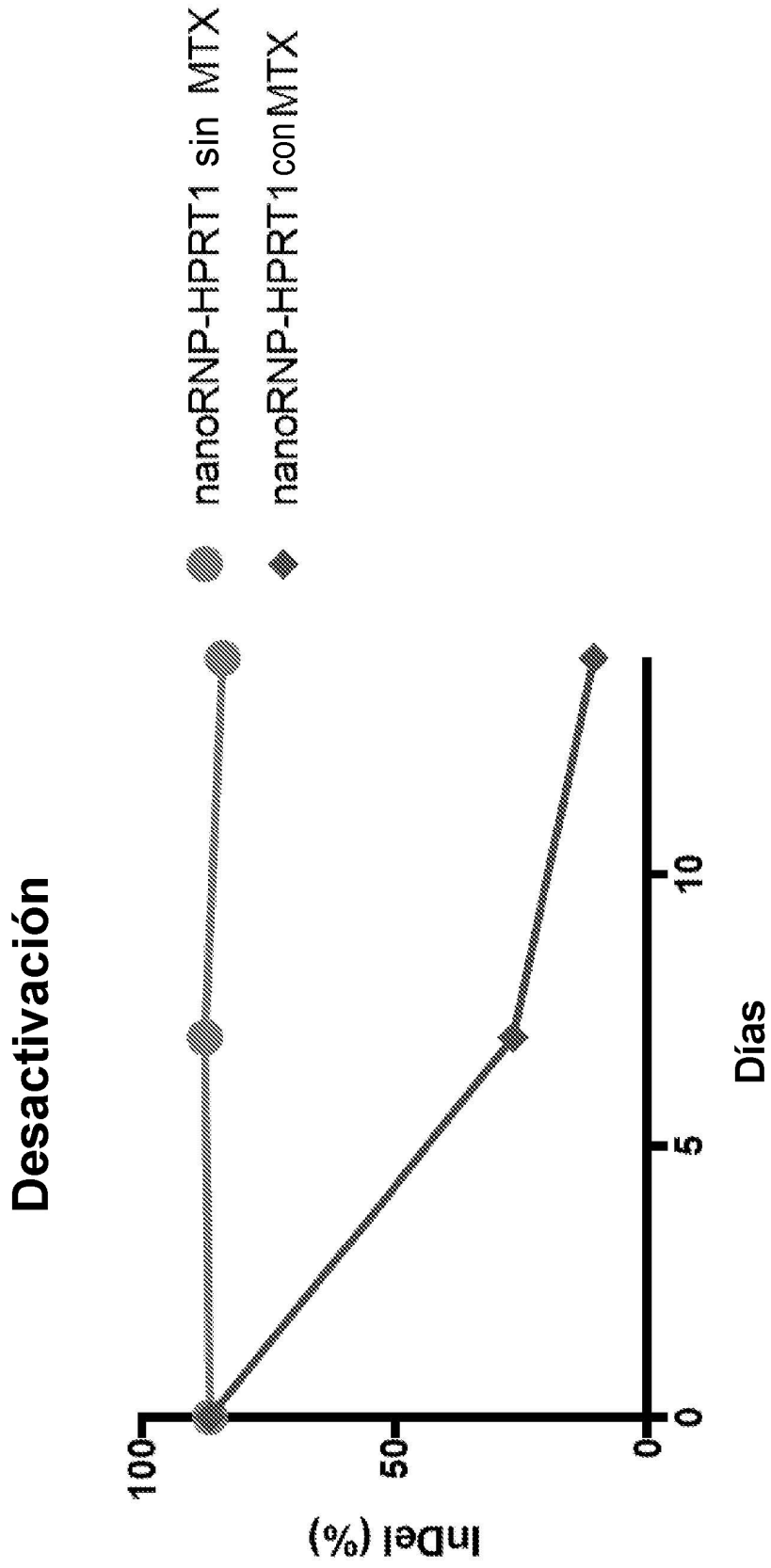


FIG. 11A



0.3uM de Metotrexato para células K562

FIG. 11B

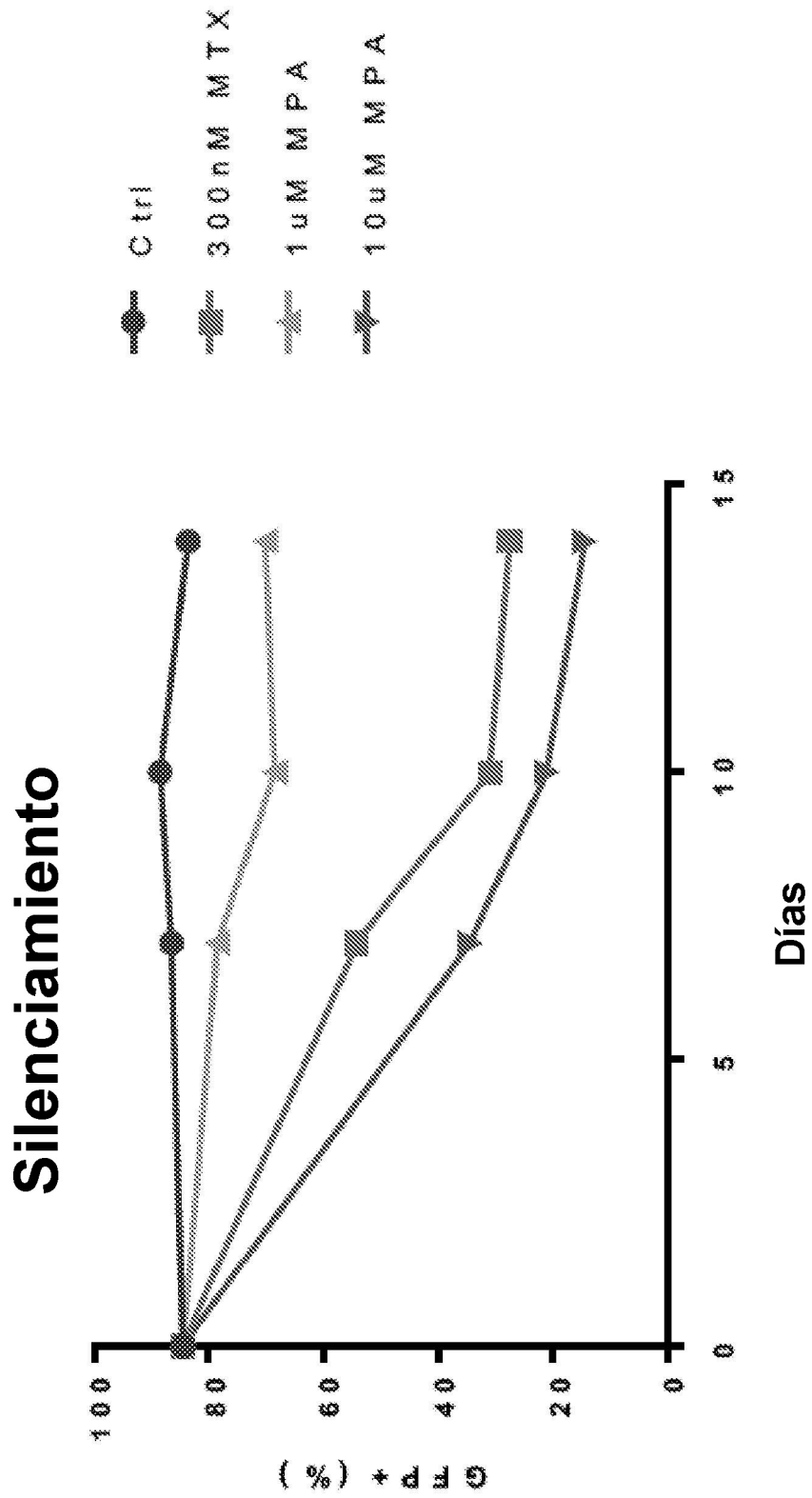


FIG. 12A

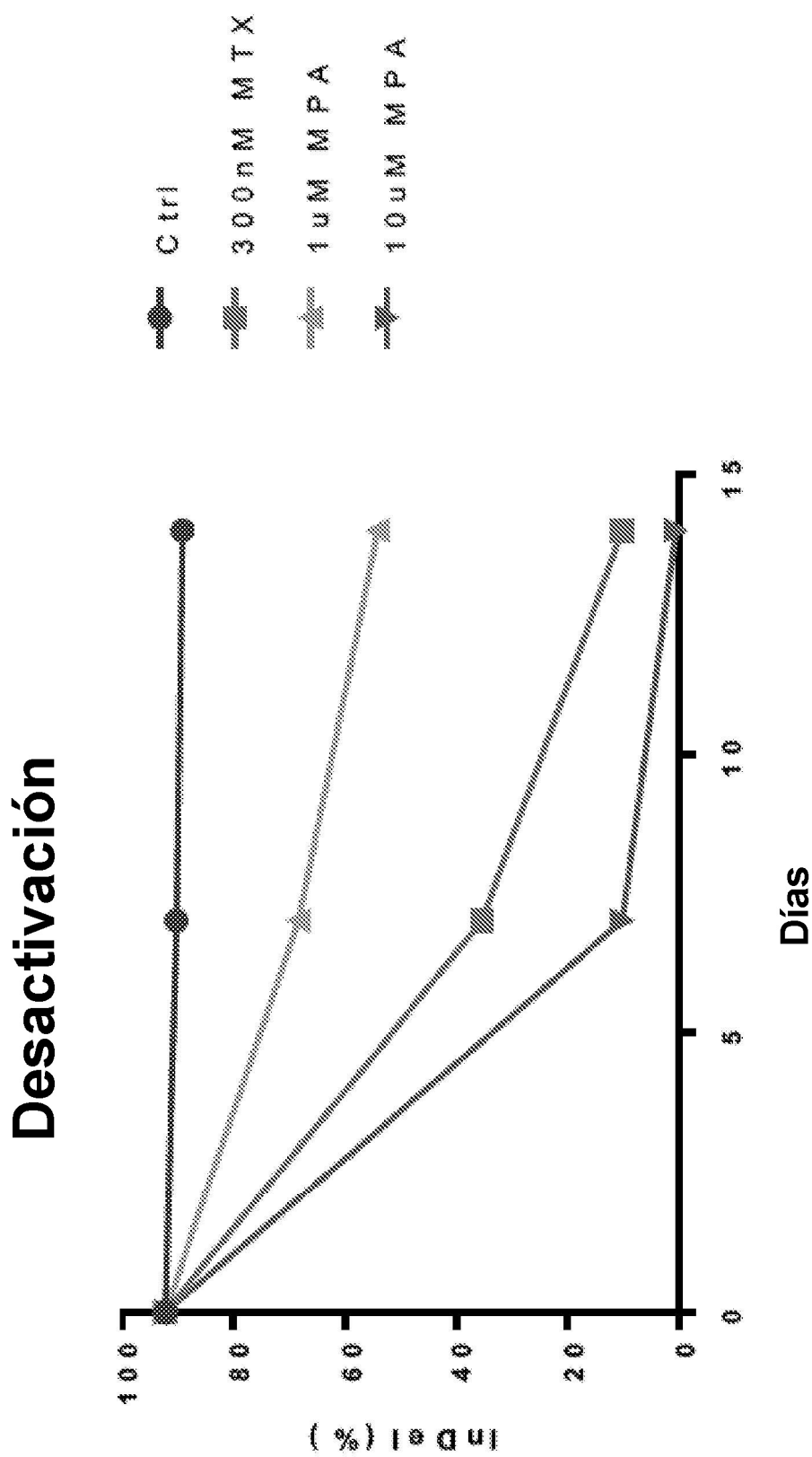


FIG. 12B

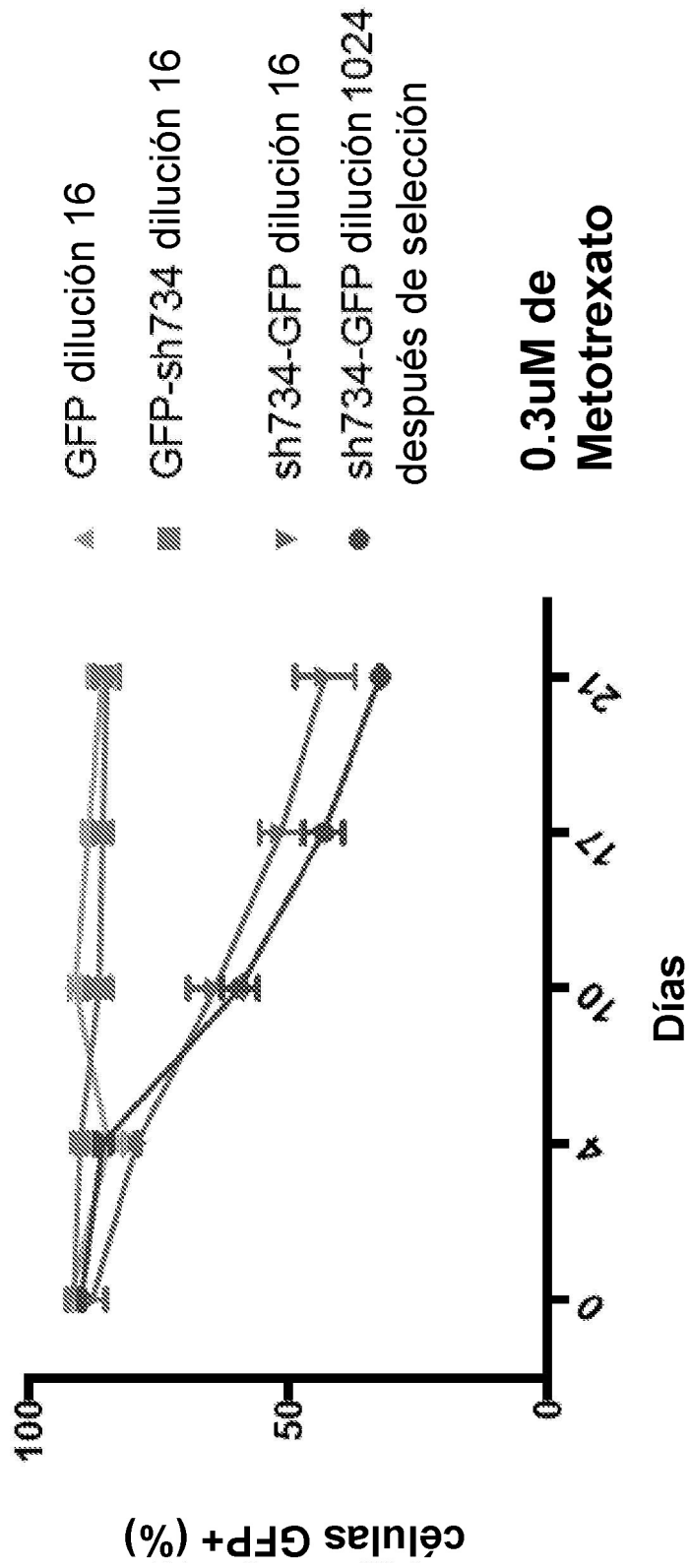


FIG. 13

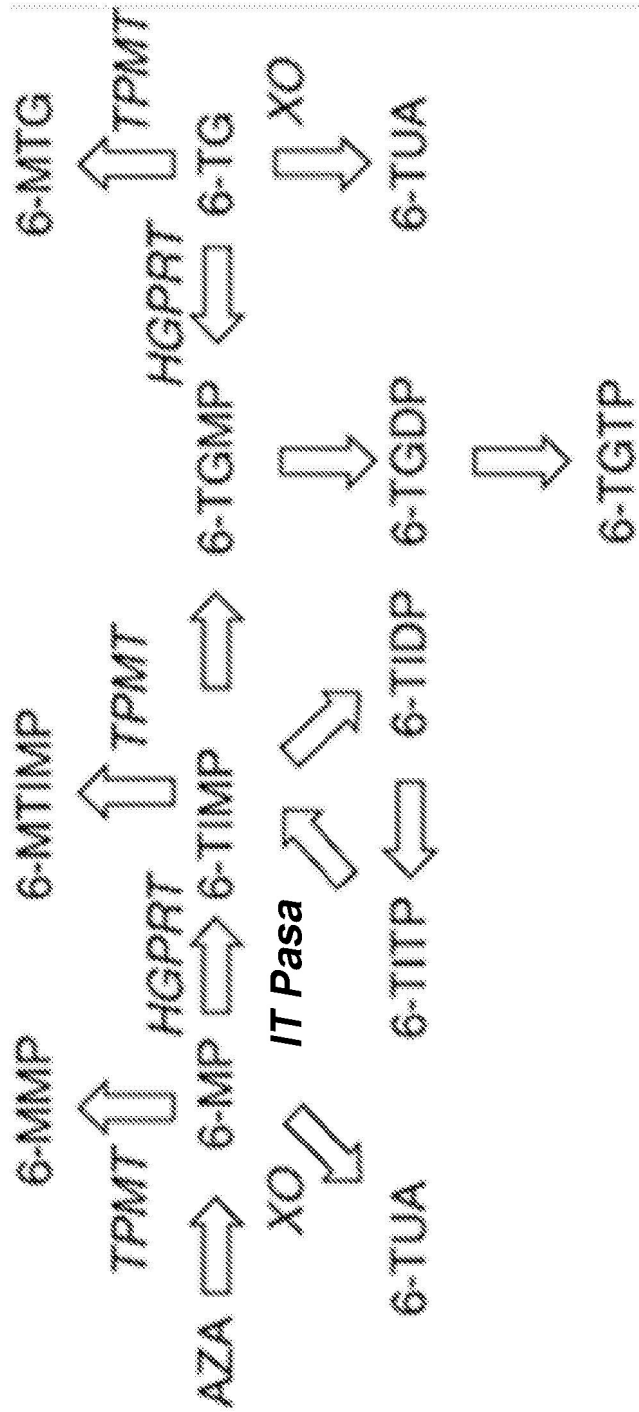


FIG. 14