

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 999 361**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/0783** (2010.01)

**C07K 14/725** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.10.2018** **PCT/US2018/058590**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.05.2019** **WO19089855**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2018** **E 18804808 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2024** **EP 3704230**

54 Título: **Proceso para generar composiciones terapéuticas de células modificadas**

30 Prioridad:

**01.11.2017 US 201762580409 P**

**08.12.2017 US 201762596771 P**

**22.08.2018 US 201862721603 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**25.02.2025**

73 Titular/es:

**JUNO THERAPEUTICS, INC. (100.00%)**

**400 Dexter Avenue North, Suite 1200**

**Seattle, WA 98109, US**

72 Inventor/es:

**LEE, SARAH Y.;**

**YEE, NATHAN;**

**WESNER, JOHN MATTHEW;**

**WEBER, CLINTON;**

**RAMSBORG, CHRISTOPHER GLEN;**

**MALLANEY, MARY;**

**LARSON, RYAN P.;**

**BONYHADI, MARK L.;**

**BEAUCHESNE, PASCAL y**

**CRISMAN, RYAN L.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

### Observaciones:

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

ES 2 999 361 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

Proceso para generar composiciones terapéuticas de células modificadas

5 **Campo**

La presente divulgación proporciona métodos para la modificación genética de linfocitos T, específicamente linfocitos T CD4+ y opcionalmente linfocitos T CD8+, para usar en terapias con linfocitos T. Los métodos proporcionados incluyen una o más etapas para incubar las células en condiciones de estimulación, introducir un polipéptido recombinante en las células mediante transducción o transfección, y cultivar las células en condiciones que promuevan la proliferación y/o expansión. La incubación y/o el cultivo se realizan en presencia de IL-2, IL-7 e IL-15. En algunos aspectos, los métodos proporcionados son medios eficaces, fiables para producir linfocitos T modificados genéticamente con un alto grado de éxito.

15 **Antecedentes**

Existen varios métodos de terapia celular para tratar enfermedades y afecciones. Entre los métodos de terapia celular se encuentran los que implican células inmunitarias, tales como linfocitos T, modificados genéticamente con un receptor recombinante, tal como un receptor de antígeno quimérico. Es necesario mejorar los métodos de fabricación y/o modificación genética de estas terapias celulares, incluyendo proporcionar un proceso más eficiente y/o un producto de composición de células mejorado. Se proporcionan métodos que satisfacen tales necesidades.

El documento WO 2016/090369 A1 describe linfocitos T modificados con un receptor de antígeno quimérico dirigido a CS1.

Gargett and Brown (2015) Cytotherapy, vol. 17, n.º 4, páginas 487 - 495, describe cómo diferentes citocinas y condiciones de estimulación influyen en la expansión y el fenotipo inmunitario de linfocitos T con receptor de antígeno quimérico de tercera generación específico del antígeno tumoral GD2.

El documento WO 2017/156479 A1 describe los receptores de antígeno quiméricos ROR1.

El documento WO 2018/191723 A1 describe métodos para evaluar la glicosilación de la superficie celular.

**Sumario**

La presente invención se define en el conjunto de reivindicaciones adjuntas. La presente invención proporciona un método para producir una composición de células modificadas genéticamente, comprendiendo el método:

(a) incubar, en condiciones de estimulación, una composición de entrada que comprende linfocitos T enriquecidos con linfocitos T humanos primarios CD4+, comprendiendo dichas condiciones de estimulación la presencia de:

(i) un reactivo estimulador, en donde el reactivo estimulador comprende un agente primario que se une específicamente a un miembro de un complejo TCR, y comprende además un agente secundario que se une específicamente a una molécula coestimuladora de linfocitos T; y

(ii) citocinas que comprenden IL-2, IL-7 e IL-15 humanas recombinantes, y  
(iii) uno o más antioxidantes;

generando así una composición estimulada;

en donde la composición de entrada comprende más de o más de aproximadamente el 70 %, más de o más de aproximadamente el 75 %, más de o más de aproximadamente el 80 %, más de o más de aproximadamente el 85 %, más de o más de aproximadamente el 90 %, más de o más de aproximadamente el 95 % o más de o más de aproximadamente el 98 % de linfocitos T humanos primarios CD4+; y/o la composición de entrada consiste esencialmente en linfocitos T humanos primarios CD4+;

(b) introducir un receptor recombinante en la composición estimulada, generando así una composición modificada genéticamente que comprende linfocitos T modificados genéticamente; y

(c) cultivar la composición modificada genéticamente en condiciones que promuevan la proliferación o la expansión de las células modificadas genéticamente, produciendo así una composición de salida que comprende los linfocitos T modificados genéticamente, y en donde:

el cultivo se realiza en presencia de citocinas que comprenden IL-2, IL-7 e IL15 humanas recombinantes;

el cultivo se realiza en presencia de un tensioactivo;

al menos una parte del cultivo se realiza con perfusión; y

el cultivo se realiza al menos hasta que la composición de salida comprende un número umbral de linfocitos T.

En algunas realizaciones, i) la concentración de IL-2 recombinante en la incubación de la etapa (a) es de 10 UI/ml a 200 UI/ml, o de aproximadamente 10 UI/ml a aproximadamente 200 UI/ml; y/o ii) en donde la concentración de IL-7

en la incubación de la etapa (a) es de 100 UI/ml a 1000 UI/ml o de aproximadamente 100 UI/ml a aproximadamente 1000 UI/ml y/o la concentración de IL-15 en la incubación de la etapa (a) es de 1 UI/ml a 50 UI/ml o de aproximadamente 1 UI/ml a aproximadamente 50 UI/ml.

- 5 En algunas realizaciones, el agente primario que se une específicamente a un miembro de un complejo TCR se une específicamente a CD3; opcionalmente en donde: i) el agente secundario que se une específicamente a una molécula coestimuladora de linfocitos T se une específicamente a una molécula coestimuladora seleccionada de CD28, CD137(4-1-BB), OX40 o ICOS; y/o ii) los agentes primarios y/o secundarios comprenden un anticuerpo, opcionalmente en donde: el reactivo estimulador comprende la incubación con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28, o  
10 un fragmento de unión a antígeno de los mismos.

- En algunas realizaciones, el agente primario y/o el agente secundario están presentes en la superficie de un soporte sólido; opcionalmente, en donde el soporte sólido es o comprende una perla; opcionalmente en donde además: i) la proporción entre perlas y células es menos de o menos de aproximadamente 3:1; y/o ii) la proporción entre perlas y  
15 células es de 2:1 a 0,5:1, o de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 0,5:1; y/o iii) la proporción entre perlas y células es de 1:1 aproximadamente.

- En algunas realizaciones, i) el uno o más antioxidantes comprenden un antioxidante que contiene azufre; y/o ii) el uno o más antioxidantes comprenden un precursor del glutatión; y/o iii) el uno o más antioxidantes comprenden N-acetil  
20 cisteína (NAC), opcionalmente en donde: la NAC está en una concentración de 0,2 mg/ml a 2,0 mg/ml, o de aproximadamente 0,2 mg/ml a aproximadamente 2,0 mg/ml.

- En algunas realizaciones, la introducción comprende transducir células de la composición estimulada con un vector vírico que comprende un polinucleótido que codifica el receptor recombinante; opcionalmente en donde: i) el vector  
25 vírico es un vector retrovírico; y/o ii) el vector vírico es un vector lentivírico o un vector gammaretrovírico; y/o iii) la introducción se lleva a cabo en presencia de un adyuvante de la transducción; opcionalmente, en donde el adyuvante de la transducción es o comprende: a) sulfato de protamina, opcionalmente de 1 µg/ml a 50 µg/ml o de aproximadamente 1 µg/ml a aproximadamente 50 µg/ml de sulfato de protamina; b) un adyuvante de la transducción derivado de la fibronectina; y/o c) RetroNectin.  
30

- En algunas realizaciones, el reactivo estimulador se elimina de la composición modificada genéticamente antes del cultivo; opcionalmente en donde: i) el reactivo estimulador se elimina en un plazo igual o inferior a 7 días después del inicio de la incubación; y/o ii) el reactivo estimulador se elimina de 3 a 6 días o de aproximadamente 3 a  
35 aproximadamente 6 días después del inicio de la incubación; y/o iii) el reactivo estimulador se elimina a o aproximadamente los 4 días después del inicio de la incubación; y/o iv) la eliminación de las perlas comprende la exposición de las células de la composición modificada genéticamente a un campo magnético.

- En algunas realizaciones, la concentración de IL-2 en el cultivo de la etapa (c) es de 50 UI/ml a 500 UI/ml o de aproximadamente 50 UI/ml a aproximadamente 500 UI/ml; y/o en donde la concentración de IL-7 en el cultivo de la  
40 etapa (c) es de 500 UI/ml a 2000 UI/ml o de aproximadamente 500 UI/ml a aproximadamente 2000 UI/ml; y/o la concentración de IL-15 en el cultivo de la etapa (c) es de 5 UI/ml a 50 UI/ml o de aproximadamente 5 UI/ml a aproximadamente 50 UI/ml.

- En algunas realizaciones, i) al menos una parte del cultivo en la etapa (c) se realiza con mezcla continua; y/o ii) el cultivo en la etapa (c) se lleva a cabo en presencia de un tensioactivo que comprende un poloxámero, opcionalmente, en donde el poloxámero está presente en una concentración de 0,5 µl/ml a 5 µl/ml o de aproximadamente 0,5 µl/ml a  
45 aproximadamente 5 µl/ml; opcionalmente, el poloxámero es el Poloxámero 188.

- En algunas realizaciones, i) el cultivo en la etapa (c) se continúa durante al menos un día después de alcanzar el número umbral de linfocitos T; y/o ii) el número umbral de linfocitos T es al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces o más mayor que el número de la composición de células modificadas genéticamente antes  
50 del cultivo; y/o iii) el cultivo en la etapa (c) se realiza durante 2 días a 10 días inclusive.

- En algunas realizaciones, después del cultivo de la etapa (c), el método comprende además la recogida de células de la composición de salida; opcionalmente en donde: i) el tiempo transcurrido entre el inicio de la incubación y la recogida de células de la composición de salida es de 7 días a 15 días o de aproximadamente 7 días a aproximadamente 15  
55 días; y/o ii) el tiempo transcurrido entre el inicio de la incubación y la recogida de células de la composición de salida es de 9 días a 13 días o de aproximadamente 9 días a aproximadamente 13 días; y/o iii) el tiempo transcurrido entre el inicio de la incubación y la recogida de células de la composición de salida es de 8 días a 13 días o de aproximadamente 8 días a aproximadamente 13 días.  
60

- En algunas realizaciones, el método comprende además la formulación de células de la composición de salida para su crioconservación y/o administración a un sujeto, opcionalmente en presencia de un excipiente farmacéuticamente aceptable; opcionalmente en donde: las células de la composición de salida se formulan en presencia de un  
65 crioprotector; opcionalmente, el crioprotector comprende DMSO.

En algunas realizaciones, el método comprende además aislar los linfocitos CD4+ de una muestra biológica antes de la incubación; opcionalmente en donde: i) el aislamiento comprende, seleccionar células en función de la expresión superficial de CD4, opcionalmente mediante selección positiva o negativa; y/o ii) el aislamiento comprende llevar a cabo una selección basada en la inmunoafinidad.

En algunas realizaciones, i) la muestra biológica comprende linfocitos T primarios obtenidos de un sujeto; opcionalmente en donde el sujeto es un sujeto humano; o ii) la muestra biológica es o comprende una muestra de sangre total, una muestra de capa leucocitaria, una muestra de células mononucleares de sangre periférica (CMSP), una muestra de linfocitos T sin fraccionar, una muestra de linfocitos, una muestra de glóbulos blancos, un producto de aféresis o un producto de leucocitaféresis.

En algunas realizaciones, el receptor recombinante es capaz de unirse a un antígeno diana asociado a, específico de y/o expresado en una célula o tejido de una enfermedad, de un trastorno o de una afección; opcionalmente en donde: i) la enfermedad, trastorno o afección es una enfermedad o trastorno infeccioso, una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria, un tumor o un cáncer; y/o ii) el antígeno diana es un antígeno tumoral; y/o iii) el antígeno diana se selecciona de 5T4, 8H9, avb6 integrina, B7-H6, antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA), CA9, un antígeno de cáncer testicular, anhidrasa carbónica 9 (CAIX), CCL-1, CD19, CD20, CD22, CEA, antígeno de superficie de la hepatitis B, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD138, CD171, antígeno carcinoembrionario (CEA), CE7, una ciclina, ciclina A2, c-Met, antígeno doble, EGFR, glucoproteína 2 epitelial (EPG-2), glucoproteína 40 epitelial (EPG-40), EPHA2, ephrinB2, erb-B2, erb-B3, erb-B4, dímeros erbB, EGFR VIII, receptor de estrógenos, AchR fetal, receptor alfa de folato, proteína fijadora de folato (FBP), FCRL5, FCRH5, receptor de acetilcolina fetal, G250/CAIX, GD2, GD3, gp100, receptor 5D acoplado a proteína G (GPCR5D), Her2/neu (receptor tirosina quinasa erbB2), HMW-MAA, IL-22R-alfa, receptor IL-13 alfa 2 (IL-13Ra2), receptor del dominio de inserción de la quinasa (kdr), cadena ligera kappa, Lewis Y, molécula de adhesión de células L1 (L1-CAM), antígeno asociado a melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MART-1, mesotelina, CMV murina, mucina 1 (MUC1), MUC16, NCAM, NKG2D, ligandos de NKG2D, NY-ESO-1, GD2 O-acetilado (OGD2), antígeno oncofetal, antígeno preferentemente expresado del melanoma (PRAME), PSCA, receptor de progesterona, survivina, ROR1, TAG72, tEGFR, receptores de VEGF, VEGF-R2, proteína del tumor de Wilms 1 (WT-1), un antígeno específico de patógenos y un antígeno asociado a una etiqueta universal.

En algunas realizaciones, i) el receptor recombinante es o comprende un receptor de antígeno no TCR funcional o un TCR o fragmento de unión a antígeno de los mismos; y/o ii) el receptor recombinante es un receptor de antígeno quimérico (CAR); y/o iii) el receptor recombinante es un CAR anti-CD19.

En algunas realizaciones, el método se realiza en menos de 21 días, ambos inclusive.

En algunas realizaciones, la composición de entrada es una primera composición de entrada que comprende linfocitos T enriquecidos con linfocitos T humanos primarios CD4+, y la composición estimulada es una primera composición estimulada, en donde el método comprende, además: (d) incubar por separado, en condiciones de estimulación, una segunda composición de entrada que comprende linfocitos T enriquecidos con linfocitos T humanos primarios CD8+, en donde: la segunda composición de entrada comprende más de aproximadamente el 70 %, más de o más de aproximadamente el 75 %, más de o más de aproximadamente el 80 %, más de o más de aproximadamente el 85 %, más de o más de aproximadamente el 90 %, más de o más de aproximadamente el 95 % o más de o más de aproximadamente el 98 % de linfocitos T humanos primarios CD8+; y/o la segunda composición de entrada consiste esencialmente en linfocitos T humanos primarios CD8+; y los linfocitos T enriquecidos con linfocitos T humanos primarios CD8+ se aíslan de la misma muestra biológica que los linfocitos T enriquecidos con linfocitos T humanos primarios CD4+; y las condiciones de estimulación comprenden la presencia de (i) un reactivo estimulador que comprende un agente primario que se une específicamente a un miembro de un complejo TCR y que comprende además un agente secundario que se une específicamente a una molécula coestimuladora de linfocitos T y (ii) una o más citocinas, generando así una segunda composición estimulada; y (e) introducir un receptor recombinante en la segunda composición estimulada, generando así una segunda composición modificada genéticamente que comprende linfocitos T modificados genéticamente; y (f) cultivar la segunda composición modificada genéticamente en condiciones que promuevan la proliferación o la expansión de las células modificadas genéticamente, produciendo así una segunda composición de salida que comprende los linfocitos T modificados genéticamente.

En algunas realizaciones, las una o más citocinas utilizadas para las condiciones de estimulación de la segunda composición de entrada se seleccionan de IL-2 recombinante e IL-15 recombinante, opcionalmente en donde: i) la concentración de IL-2 recombinante es de 10 UI/ml a 200 UI/ml; y/o ii) la concentración de IL-15 recombinante es de 1 UI/ml a 25 UI/ml.

En algunas realizaciones, introducir un receptor recombinante en la segunda composición estimulada comprende transducir células de la segunda composición estimulada con un vector vírico que comprende un polinucleótido que codifica el receptor recombinante, opcionalmente en donde: i) el vector vírico es un vector retrovítico; y/o ii) el vector vírico es un vector lentivítico o un vector gammaretrovítico; y/o iii) la introducción se lleva a cabo en presencia de un adyuvante de la transducción.



En algunas realizaciones, el cultivo de la segunda composición modificada genéticamente se realiza al menos hasta que la segunda composición de salida incluye un número umbral de linfocitos T, opcionalmente en donde: i) el cultivo de la segunda composición modificada genéticamente se continúa durante al menos un día después de alcanzar el número umbral de linfocitos T; y/o ii) el número umbral es al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces o más mayor que el número de la segunda composición de células modificadas genéticamente antes de cultivar la segunda composición modificada genéticamente.

En algunas realizaciones, después de cultivar la segunda composición modificada genéticamente, el método comprende además la recogida de células de la segunda composición de salida; opcionalmente en donde: i) el tiempo transcurrido entre el inicio de la incubación y la recogida de células de la segunda composición de salida es de 7 días a 15 días o de aproximadamente 7 días a aproximadamente 15 días; y/o ii) el tiempo transcurrido entre el inicio de la incubación y la recogida de células de la segunda composición de salida es de 9 días a 13 días o de aproximadamente 9 días a aproximadamente 13 días; y/o iii) el tiempo transcurrido entre el inicio de la incubación y la recogida de células de la segunda composición de salida es de 8 días a 13 días o de aproximadamente 8 días a aproximadamente 13 días.

En algunas realizaciones, el método comprende además formular células de la segunda composición de salida para su crioconservación y/o administración a un sujeto, opcionalmente en presencia de un excipiente farmacéuticamente aceptable; opcionalmente, en donde las células de la segunda composición de salida se formulan en presencia de un crioprotector; opcionalmente, el crioprotector comprende DMSO.

En algunas realizaciones, el receptor recombinante que se introduce en la segunda composición estimulada es el mismo receptor recombinante, opcionalmente el CAR, opcionalmente el CAR anti-CD19, que se introduce en la primera composición estimulada.

En algunas realizaciones, la segunda composición de salida que comprende el número umbral o número mayor de células se produce entre más de o más de aproximadamente el 85 %, más de o más de aproximadamente el 90 % o más de o más de aproximadamente el 95 % de las iteraciones del método.

En algunas realizaciones, el método se realiza en menos de 21 días, ambos inclusive.

En algunas realizaciones, la concentración de IL-2 recombinante es de 10 UI/ml a 200 UI/ml o de aproximadamente 10 a aproximadamente 200 UI/ml. En algunas realizaciones de los métodos proporcionados en el presente documento, la concentración de IL-7 es de 100 UI/ml a 1000 UI/ml o de aproximadamente 100 UI/ml a aproximadamente 1000 UI/ml y/o la concentración de IL-15 es de 1 UI/ml a 50 UI/ml o de aproximadamente 1 UI/ml a aproximadamente 50 UI/ml.

En algunas realizaciones de los métodos proporcionados en el presente documento, el reactivo estimulador incluye un agente primario que se une específicamente a CD3. En algunas realizaciones, el reactivo estimulador incluye además un agente secundario que se une específicamente a una molécula coestimuladora de linfocitos T, en donde la molécula coestimuladora se selecciona entre CD28, CD137(4-1-BB), OX40 o ICOS. En algunas realizaciones de los métodos proporcionados en el presente documento, los agentes primarios y/o secundarios incluyen un anticuerpo, opcionalmente, en donde el reactivo estimulador incluye la incubación con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28, o un fragmento de unión a antígeno de los mismos. En algunas realizaciones, el agente primario y/o el agente secundario están presentes en la superficie de un soporte sólido.

En algunas realizaciones de los métodos proporcionados en el presente documento, el soporte sólido es o incluye una perla. En algunas realizaciones, la perla tiene un diámetro superior a o superior a aproximadamente 3,5 µm pero no más de aproximadamente 9 µm o no más de aproximadamente 8 µm o no más de aproximadamente 7 µm o no más de aproximadamente 6 µm o no más de aproximadamente 5 µm. En algunas realizaciones, la perla tiene un diámetro de o aproximadamente 4,5 µm. En algunas realizaciones, la perla es inerte. En algunas realizaciones, la perla es o incluye una superficie de poliestireno. En algunas realizaciones, la perla es magnética o superparamagnética. En algunas realizaciones, la proporción entre perlas y células es inferior a 3:1 o inferior a aproximadamente 3:1. En algunas realizaciones, la proporción entre perlas y células es de 2:1 a 0,5:1 o de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 0,5:1. En algunas realizaciones, la proporción entre perlas y células es de o aproximadamente 1:1.

En algunas realizaciones de los métodos proporcionados en el presente documento, el uno o más antioxidantes incluyen un antioxidante que contiene azufre. En algunas realizaciones, el uno o más antioxidantes incluyen un precursor del glutatión. En algunas realizaciones, el uno o más antioxidantes incluyen N-acetil cisteína (NAC), opcionalmente, con una concentración de NAC de 0,2 mg/ml a 2,0 mg/ml o de aproximadamente 0,2 mg/ml a aproximadamente 2,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de los métodos proporcionados en el presente documento, la introducción incluye transducir células de la composición estimulada con un vector vírico que contiene un polinucleótido que codifica el receptor recombinante. En algunas realizaciones, el vector vírico es un vector retrovírico. En algunas realizaciones, el vector vírico es un vector lentivírico o un vector gammaretrovírico. En algunas realizaciones de los métodos proporcionados

en el presente documento, la introducción se lleva a cabo en presencia de un adyuvante de la transducción. En algunas realizaciones, el adyuvante de la transducción es o comprende sulfato de protamina, opcionalmente de 1 µg/ml a 50 µg/ml o de aproximadamente 1 µg/ml a aproximadamente 50 µg/ml de sulfato de protamina; un adyuvante de la transducción derivado de la fibronectina; y/o RetroNectin. En otras realizaciones de los métodos proporcionados en el presente documento, la introducción incluye transfectar las células de la composición estimulada con un vector que contiene un polinucleótido que codifica el receptor recombinante. En algunas realizaciones, el vector es un transposón, opcionalmente un transposón Bella Durmiente (SB) o un transposón PiggyBac.

En algunas realizaciones, el reactivo estimulador se elimina de la composición modificada genéticamente antes del cultivo.

En algunas realizaciones, el agente estimulador se elimina en un plazo igual o inferior a 7 días después del inicio de la incubación. En algunas realizaciones, el reactivo estimulador se elimina de 3 a 6 días o de aproximadamente 3 a aproximadamente 6 días después del inicio de la incubación. En algunas realizaciones, el reactivo estimulador se elimina a o aproximadamente los 4 días después del inicio de la incubación. En algunas realizaciones, la eliminación de las perlas incluye la exposición de las células de la composición modificada genéticamente a un campo magnético.

En algunas realizaciones, la proliferación o la expansión tiene como resultado un aumento de, aproximadamente, o al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, o superior a 5 veces el número de linfocitos T CD4+ modificados genéticamente con un receptor recombinante.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos proporcionados en el presente documento, la composición de células modificadas genéticamente incluye más de aproximadamente el 70 %, más de o más de aproximadamente el 75 %, más de o más de aproximadamente el 80 %, más de o más de aproximadamente el 85 %, más de o más de aproximadamente el 90 %, más de o más de aproximadamente el 95 % o más de o más de aproximadamente el 98 % de linfocitos T humanos primarios CD4+ o linfocitos CD4+ que expresan el receptor recombinante; y/o la composición de células modificadas genéticamente consiste esencialmente en linfocitos T humanos primarios CD4+. En algunas realizaciones de los métodos proporcionados en el presente documento, la concentración de IL-2 recombinante es de 50 UI/ml a 500 UI/ml o de aproximadamente 50 UI/ml a aproximadamente 500 UI/ml. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos proporcionados en el presente documento, la concentración de IL-7 es de 500 UI/ml a 2000 UI/ml o de aproximadamente 500 UI/ml a aproximadamente 2000 UI/ml y/o la concentración de IL-15 es de 5 UI/ml a 50 UI/ml o de aproximadamente 5 UI/ml a aproximadamente 50 UI/ml.

En algunas realizaciones, al menos una parte del cultivo se realiza con mezcla continua.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos proporcionados en el presente documento, el tensioactivo incluye un poloxámero, opcionalmente, en donde el poloxámero está presente en una concentración de 0,5 µl/ml a 5 µl/ml o de aproximadamente 0,5 µl/ml a aproximadamente 5 µl/ml. En algunas realizaciones, el poloxámero es el poloxámero 188.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos proporcionados en el presente documento, la composición de células modificadas genéticamente no incluye un reactivo estimulador y/o el reactivo estimulador se ha eliminado sustancialmente de la composición antes del cultivo, conteniendo dicho reactivo estimulador un reactivo capaz de activar uno o más dominios de señalización intracelular de uno o más componentes de un complejo TCR y/o uno o más dominios de señalización intracelular de una o más moléculas coestimuladoras.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos proporcionados en el presente documento, el cultivo se realiza al menos hasta que la composición de salida incluye un número umbral de linfocitos T. En algunas realizaciones, el cultivo se continúa durante al menos un día después de que se alcance el número umbral de linfocitos T. En algunas realizaciones, el número umbral es al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces o más superior al número de la composición de células modificadas genéticamente antes del cultivo. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos proporcionados en el presente documento, el cultivo se realiza durante 2 días a 10 días inclusive, y/o el cultivo se realiza durante al menos 10 días. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos proporcionados en el presente documento, después del cultivo, recogida de las células colectoras de la composición de salida. En algunas realizaciones, el tiempo transcurrido entre el inicio de la incubación y la recogida de células de la composición de salida es de 7 días a 15 días o de aproximadamente 7 días a aproximadamente 15 días. En algunas realizaciones, el tiempo transcurrido entre el inicio de la incubación y la recogida de células de la composición de salida es de 9 días a 13 días o de aproximadamente 9 días a aproximadamente 13 días. En algunas realizaciones, el tiempo transcurrido entre el inicio de la incubación y la recogida de células de la composición de salida es de 8 días a 13 días o de aproximadamente 8 días a aproximadamente 13 días.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos proporcionados en el presente documento, el método implica además formular células de la composición de salida para su crioconservación y/o administración a un sujeto, opcionalmente en presencia de un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, las células de la composición de salida se formulan en presencia de un crioprotector. En algunas realizaciones, el crioprotector incluye DMSO. En algunas realizaciones, las células de la composición de salida se formulan en un recipiente,

opcionalmente un vial o una bolsa.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos proporcionados en el presente documento, el método implica además aislar los linfocitos T CD4+ y/o CD8+ de una muestra biológica antes de la incubación. En algunas realizaciones, el aislamiento incluye la selección de células en función de la expresión superficial de CD4 y/o CD8, opcionalmente mediante selección positiva o negativa. En algunas realizaciones, el aislamiento incluye llevar a cabo la selección por inmunofluorescencia. En algunas realizaciones, la muestra biológica incluye linfocitos T primarios obtenidos de un sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto es un sujeto humano. En algunas realizaciones, la muestra biológica es o incluye una muestra de sangre total, una muestra de capa leucocitaria, una muestra de células mononucleares de sangre periférica (CMSP), una muestra de linfocitos T sin fraccionar, una muestra de linfocitos, una muestra de glóbulos blancos, un producto de aféresis o un producto de leucocitaféresis.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos proporcionados en el presente documento, el receptor recombinante es capaz de unirse a un antígeno diana asociado a, específico de y/o expresado en una célula o tejido de una enfermedad, de un trastorno o de una afección. En algunas realizaciones, la enfermedad, trastorno o afección es una enfermedad o trastorno infeccioso, una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria, un tumor o un cáncer. En algunas realizaciones, el antígeno diana es un antígeno tumoral. En algunas realizaciones, el antígeno diana se selecciona de 5T4, 8H9, avb6 integrina, B7-H6, antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA), CA9, un antígeno de cáncer testicular, anhidrasa carbónica 9 (CAIX), CCL-1, CD19, CD20, CD22, CEA, antígeno de superficie de la hepatitis B, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD138, CD171, antígeno carcinoembrionario (CEA), CE7, una ciclina, ciclina A2, c-Met, antígeno doble, EGFR, glucoproteína 2 epitelial (EPG-2), glucoproteína 40 epitelial (EPG-40), EPHA2, ephrinB2, erb-B2, erb-B3, erb-B4, dímeros erBB, EGFR vIII, receptor de estrógenos, AchR fetal, receptor alfa de folato, proteína fijadora de folato (FBP), FCRL5, FCRH5, receptor de acetilcolina fetal, G250/CAIX, GD2, GD3, gp100, receptor 5D acoplado a proteína G (GPCR5D), Her2/neu (receptor tirosina quinasa erBB2), HMW-MAA, IL-22R-alfa, receptor IL-13 alfa 2 (IL-13Ra2), receptor del dominio de inserción de la quinasa (kdr), cadena ligera kappa, Lewis Y, molécula de adhesión de células L1 (L1-CAM), antígeno asociado a melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MART-1, mesotelina, CMV murina, mucina 1 (MUC1), MUC16, NCAM, NKG2D, ligandos de NKG2D, NY-ESO-1, GD2 O-acetilado (OGD2), antígeno oncofetal, antígeno preferentemente expresado del melanoma (PRAME), PSCA, receptor de progesterona, survivina, ROR1, TAG72, tEGFR, receptores de VEGF, VEGF-R2, proteína del tumor de Wilms 1 (WT-1), un antígeno específico de patógenos y un antígeno asociado a una etiqueta universal.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos proporcionados en el presente documento, el receptor recombinante es o incluye un receptor de antígeno no TCR funcional o un TCR o fragmento de unión a antígeno de los mismos. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos proporcionados en el presente documento, el receptor recombinante es un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos proporcionados en el presente documento, el receptor recombinante es un CAR anti-CD19. En algunas realizaciones, el receptor de antígeno quimérico incluye un dominio extracelular que contiene un dominio de unión a antígeno. En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno es o incluye un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo, que es opcionalmente un fragmento de cadena sencilla. En algunas realizaciones, el fragmento incluye regiones variables de anticuerpos unidas por un enlazador flexible. En algunas realizaciones, el fragmento incluye un scFv.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos proporcionados en el presente documento, el receptor de antígeno quimérico incluye además un espaciador y/o una región bisagra. En algunas realizaciones, el receptor de antígeno quimérico incluye una región de señalización intracelular. En algunas realizaciones, la región de señalización intracelular incluye un dominio de señalización intracelular. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular es o incluye un dominio de señalización primario, un dominio de señalización capaz de inducir una señal de activación primaria en un linfocito T, un dominio de señalización de un componente del receptor de linfocitos T (TCR), y/o un dominio de señalización que contiene un motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM). En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular es o incluye un dominio de señalización intracelular de una cadena CD3, opcionalmente una cadena CD3-zeta (CD3ζ), o una porción de señalización de la misma.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos proporcionados en el presente documento, el receptor de antígeno quimérico incluye además un dominio transmembrana dispuesto entre el dominio extracelular y la región de señalización intracelular. En algunas realizaciones, la región de señalización intracelular incluye además una región de señalización coestimuladora. En algunas realizaciones, la región de señalización coestimuladora incluye un dominio de señalización intracelular de una molécula coestimuladora de linfocitos T o una porción de señalización de la misma. En algunas realizaciones, la región de señalización coestimuladora incluye un dominio de señalización intracelular de un CD28, un 4-1BB o un ICOS o una porción de señalización de los mismos. En algunas realizaciones, la región de señalización coestimuladora se encuentra entre el dominio transmembrana y la región de señalización intracelular.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos proporcionados en el presente documento, la composición de salida que contiene el número umbral o número mayor de células se produce entre más de o más de aproximadamente el 85 % más de o más de aproximadamente el 90 % o más de o más de aproximadamente el 95 % de las iteraciones

del método. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el método se realiza en menos de 21 días, ambos inclusive.

En algunas realizaciones, la composición incluye además un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición incluye un crioprotector, opcionalmente DMSO.

En algunas realizaciones, la composición de salida es una composición de linfocitos T CD4+ modificados genéticamente.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el método se realiza en menos de 21 días, ambos inclusive.

### Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** muestra un gráfico que muestra los recuentos celulares totales de las composiciones de linfocitos CD4+ (símbolos en negro) y CD8+ (símbolos en blanco) obtenidos de la misma muestra de leucocitaféresis medidos en diferentes puntos temporales durante la estimulación, transducción y expansión de las células durante los procesos alternativos (triángulos) e ilustrativos (círculos) para generar células que expresan el receptor de antígeno quimérico (CAR) anti-CD19 descrito en el Ejemplo 1. La línea horizontal discontinua indica el umbral de recuento de células necesario para cumplir los criterios de cosecha.

Las **Figuras 2A-2D** muestran el recuento de células viables (RCV;  $\times 10^6$  células/ml) y la viabilidad celular (%), evaluados mediante monitorización continua por DHM diferencial (línea "continua") o muestreo manual ("manual", puntos, en linfocitos CD4+ del Donante 1 del Experimento 1 (**Figura 2A**), Experimento 1 Donante 2 (**Figura 2B**) o Experimento 2 Donante 3 (**Figura 2C**), o linfocitos CD8+ del Experimento 2 Donante 3 (**Figura 2D**). Los paneles superiores muestran las mediciones de cada uno, los paneles inferiores muestran el análisis de regresión lineal y el  $R^2$  y la pendiente (s), para comparar la monitorización continua y el muestreo manual.

La **Figura 3** representa el recuento de células viables (RCV;  $\times 10^6$  células/ml) y la viabilidad celular (%), evaluados mediante monitorización continua por DHM diferencial, en un proceso de expansión automatizado en comparación con un proceso de expansión manual.

### Descripción detallada

En algunos de los casos divulgados en el presente documento se describen realizaciones de la invención. Las referencias en el presente documento a métodos de tratamiento que utilizan productos se refieren a dichos productos para su uso en dichos métodos de tratamiento. En el presente documento se divulgan métodos para generar o producir composiciones de células modificadas genéticamente, tales como linfocitos T CD4+ y/o CD8+ modificados genéticamente, que expresan un receptor recombinante. En casos particulares, los métodos se utilizan con relación a un proceso que incluye la incubación de células en condiciones de estimulación; células modificadas genéticamente, p. ej., introduciendo un polinucleótido que codifica un receptor recombinante, y/o cultivando las células modificadas genéticamente en condiciones que promuevan la proliferación y/o expansión celular. En algunos casos, las células son una composición de células enriquecidas en linfocitos T CD4+ (en lo sucesivo también denominada composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos). En algunos casos, las células son una composición de células enriquecidas en linfocitos T CD8+ (en lo sucesivo también denominada composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos). En algunos casos, los métodos se llevan a cabo para generar o producir dos o distintas composiciones de linfocitos T modificados genéticamente, en los que cada uno de ellos está modificado genéticamente con el mismo receptor recombinante procedente de células de la misma muestra biológica (p. ej., del mismo sujeto), tal como incubando por separado, modificación genética y cultivo de composiciones separadas de linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+.

Existen diferentes procesos para generar poblaciones de linfocitos T modificados genéticamente, incluso para generar linfocitos T modificados genéticamente que expresen un receptor de antígeno quimérico. Sin embargo, en algunos casos, algunos de estos procesos pueden requerir mucho o relativamente mucho tiempo para generar las células modificadas genéticamente. En algunos casos, algunos de los procesos existentes pueden variar en cuanto al tiempo requerido para generar linfocitos T modificados genéticamente a partir de muestras obtenidas de diferentes sujetos. Por ejemplo, en algunos casos, el mismo proceso puede requerir 5, 6, 7 o más días para generar células modificadas genéticamente para un sujeto que para otro sujeto. En determinados casos, algunos de los procesos pueden variar en su capacidad para generar con éxito células modificadas genéticamente adecuadas para la terapia a partir de diferentes sujetos. En casos particulares, la variabilidad y/o la falta de previsibilidad de algunos procesos pueden plantear problemas a los médicos, por ejemplo, como la dificultad para determinar si una terapia celular puede producirse para un sujeto dado, o por ejemplo, dificultad para planificar o coordinar la administración de una terapia celular cuando se desconoce el momento de su disponibilidad.

Los casos divulgados abordan una o más de estas cuestiones. En casos particulares, los métodos divulgados generan linfocitos T modificados genéticamente adecuadas para la terapia, p. ej., terapia de células autólogas, en poco o relativamente poco tiempo en comparación con algunos procesos existentes. Por otro lado, en algunos casos, los métodos divulgados dan como resultado un producto más constante y menos variable, en términos del tiempo requerido para producir células modificadas genéticamente a partir de muestras recogidas entre diferentes sujetos. En

casos particulares, los métodos divulgados son capaces de generar con éxito linfocitos T modificados genéticamente adecuados para la terapia celular a partir de una elevada proporción de sujetos. Por lo tanto, en determinados casos, los métodos descritos en el presente documento proporcionan un medio relativamente rápido y eficaz para generar linfocitos T modificados genéticamente para terapias. Estos rasgos distintivos pueden permitir que más sujetos  
5 potenciales sean tratados con terapias de linfocitos T, tales como las terapias con linfocitos T autólogos, y puede mejorar algunas de las dificultades asociadas a la planificación y coordinación de la terapia celular para un sujeto.

En algunos casos, los procesos divulgados acortan la duración de la expansión y/o son capaces de generar producto dentro de una ventana de duración más estrecha en comparación con otros productos, en una gama más amplia de  
10 muestras de partida (incluidas aquellas en las que, de otro modo, no se alcanzarían los umbrales de cosecha) y, en algunos casos, puede reducir los fallos debidos a una mala expansión celular.

En determinados casos, los métodos divulgados se utilizan con relación a un proceso de generación de linfocitos T CD4+ modificados genéticamente que expresan un receptor recombinante, p. ej., un receptor de antígeno quimérico.  
15 En casos particulares, los linfocitos T CD4+ se incuban y/o cultivan en presencia de IL-2 recombinante. Generalmente, los procesos alternativos para generar linfocitos T CD4+ modificados genéticamente no implican ni requieren la adición de IL-2 recombinante con linfocitos T CD4+ porque, en algunos casos, se entiende por lo general que los linfocitos T CD4+ cultivados producen y/o secretan IL-2. Sin embargo, sin desear quedar ligados a teoría alguna, algunos casos contemplan que los linfocitos T CD4+ derivados de algunos pacientes, tales como sujetos enfermos y/o sujetos cuyos  
20 linfocitos T contienen uno o más rasgos distintivos asociados a células no sanas, no producen ni secretan IL-2 en cantidades suficientes. En determinados casos, dichos linfocitos T CD4+ no crecerán, proliferarán y/o expandirán sin suplementación de IL-2 recombinante. Por lo tanto, en determinados casos, mediante la inclusión de IL-2 recombinante en el proceso de cultivo y modificación genética de linfocitos T CD4+, los métodos divulgados amplían el conjunto de sujetos que pueden proporcionar linfocitos T CD4+ que pueden ser modificados genéticamente y, por tanto, amplían  
25 el conjunto de sujetos que pueden ser tratados con una terapia celular autóloga que contenga linfocitos T CD4+ modificados genéticamente.

En determinados casos, las células se incuban en condiciones de estimulación con un reactivo estimulador, p. ej., una perla conjugada con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, antes de la modificación genética, p. ej., transducción o  
30 transfección, de las células. En algunos casos, el reactivo estimulador se separa o se elimina de las células antes del inicio de la etapa de cultivo y en un plazo de 7 días o antes, p. ej., a o a aproximadamente los 4 o 5 días, después del inicio o comienzo de la incubación. Casos particulares contemplan que cuando el reactivo estimulador es eliminado o separado de las células en un momento anterior del proceso, entonces las células tienen una supervivencia mejorada y experimentarán una proliferación y/o expansión más robusta durante la etapa de cultivo que las células que se  
35 cultivan en procesos alternativos que o bien no separan o eliminan el reactivo estimulador o lo hacen en un momento posterior durante el proceso. En dichos casos, las células cultivadas alcanzan un recuento celular objetivo o umbral, densidad, y/o expansión más rápida que las células que se cultivan en los procesos alternativos. Por lo tanto, en algunos casos, la eliminación o separación del reactivo estimulador de las células en un plazo de 7 días o antes desde el inicio o comienzo de la incubación permite que el proceso de generación o producción de células modificadas  
40 genéticamente se complete en un periodo de tiempo más corto que los procesos alternativos.

En algunos casos, los métodos divulgados en el presente documento se utilizan con relación a un proceso que genera linfocitos T modificados genéticamente en un corto periodo de tiempo. En determinados casos, la corta duración del  
45 proceso puede aumentar la tasa, casos y/o probabilidad de generar una composición de linfocitos T modificados genéticamente que pueda administrarse a un sujeto para terapia celular. En algunos casos, los protocolos de fabricación de composiciones de células terapéuticas pueden requerir que las composiciones de células se produzcan y liberen para perfusión, p. ej., verificadas y/o determinadas como adecuadas para su administración a un sujeto, dentro de un cierto periodo de tiempo. En algunos casos, se podría esperar que la corta duración del proceso divulgado redujera o eliminara los fallos del proceso que se producirían por composiciones de células que no consiguen  
50 expandirse en el tiempo requerido.

En casos particulares, los métodos divulgados en el presente documento se utilizan con relación al cultivo de células modificadas genéticamente en condiciones que promueven la proliferación y/o expansión. En algunos casos, el cultivo  
55 se realiza en un entorno que permite la mezcla y/o perfusión constante de las células cultivadas, tal como en un biorreactor o asociado a él. En algunos casos, la al menos una parte del cultivo se realiza con una mezcla constante y con una perfusión lenta y constante para sustituir los medios utilizados por medios frescos. En determinados casos, las células se cultivan inicialmente en condiciones estáticas, p. ej., sin perfusión ni mezcla, y luego se cultivan con mezcla y perfusión constantes cuando las células cultivadas alcanzan un recuento o densidad celular predeterminados, y/o una vez que las células se han cultivado inicialmente durante un periodo de tiempo  
60 predeterminado. En algunos de dichos casos, las células cultivadas alcanzan un recuento celular objetivo o umbral, densidad, y/o expansión más rápida que las células que se cultivan en los procesos alternativos. Por lo tanto, en algunos casos, el cultivo con mezcla y/o perfusión constantes permite completar el proceso de generación o producción de células modificadas genéticamente en un periodo de tiempo más corto que un proceso alternativo en donde las células se cultivan en condiciones estáticas.

En casos particulares, los métodos divulgados se utilizan con relación a un proceso para producir o generar

eficientemente células modificadas genéticamente que son adecuadas para su uso en una terapia celular. En determinados casos, el tiempo, condiciones y reactivos utilizados en cada etapa del proceso mejoran la eficacia de cada etapa posterior y/o del proceso global. Por ejemplo, en algunos casos, las células pueden incubarse con un reactivo, p. ej., un reactivo estimulador o un adyuvante de la transducción, en concentraciones suficientemente elevadas para lograr el efecto deseado, p. ej., estimulación de las células o mejora de la eficacia de la transducción, pero a concentraciones lo suficientemente bajas como para evitar que se ralentice el crecimiento o se reduzca la supervivencia en las fases posteriores del procesado. De forma adicional, en algunos casos, las etapas del proceso se programan para que comiencen o finalicen en momentos específicos con el fin de mejorar la eficacia de las etapas posteriores y/o de todo el proceso. Por ejemplo, en algunos casos, las etapas para la incubación y la modificación genética (p. ej., transducción o transfección de las células) se completan antes en el proceso que en métodos alternativos, que, en determinados casos, mejora la supervivencia y/o la salud, y/o la velocidad de proliferación y expansión de las células durante la etapa de cultivo posterior. Por lo tanto, en un caso, el momento, condiciones y reactivos específicos de cada etapa influye en las células más allá de la etapa individual y, en determinados casos, influyen en el rendimiento de todo el proceso.

En algunos casos, los métodos se utilizan con relación a un proceso que genera o produce células modificadas genéticamente que son adecuadas para la terapia celular de una manera que puede ser más rápida y eficiente que los procesos alternativos. En determinados casos, los métodos divulgados en el presente documento tienen una alta tasa de éxito para generar o producir composiciones de células modificadas genéticamente a partir de una población más amplia de sujetos que lo que puede ser posible a partir de procesos alternativos. En determinados casos, las células modificadas genéticamente producidas o generadas por los métodos divulgados pueden tener una mayor salud, viabilidad, activación, y pueden tener una mayor expresión del receptor recombinante que las células producidas por métodos alternativos. Por lo tanto, en algunos casos, la rapidez y eficacia de los métodos divulgados para generar células modificadas genéticamente para terapia celular permiten planificar y coordinar más fácilmente los tratamientos de terapia celular, tales como la terapia autóloga, a una población de sujetos más amplia de lo que sería posible con algunos métodos alternativos.

A menos que se defina de otro modo, se pretende que todos los términos de la técnica, las notaciones y otros términos o terminología técnica y científica utilizados en el presente documento tengan el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto habitual en la materia a la que pertenece la materia objeto reivindicada. En algunos casos, los términos con significados comúnmente comprendidos se definen en el presente documento con fines de claridad y/o para tener una referencia inmediata, y la inclusión de dichas definiciones en el presente documento no se ha de considerar necesariamente como representativa de una diferencia sustancial frente a lo que se comprende en la materia.

Si una definición expuesta en el presente documento es contraria, o de otro modo incoherente, con una definición expuesta en las patentes, solicitudes, solicitudes publicadas y otras publicaciones a las que se hace referencia en el presente documento, la definición expuesta en el presente documento prevalece sobre la definición a la que se hace referencia.

Los encabezados de sección utilizados en el presente documento son sólo con fines organizativos y no han de interpretarse como una limitación de la materia objeto descrita.

## **I. PROCESO DE GENERACIÓN DE CÉLULAS MODIFICADAS GENÉTICAMENTE**

En el presente documento se describen métodos para generar una composición de salida de células modificadas genéticamente, tales como linfocitos T CD4+ modificados genéticamente y/o linfocitos T CD8+ modificados genéticamente, que expresan una proteína recombinante, p. ej., un receptor recombinante tal como un receptor de linfocitos T (TCR) o un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunos casos, los métodos divulgados en el presente documento se utilizan con relación a la fabricación, generación o producción de una terapia celular, y pueden utilizarse con relación a etapas de procesamiento adicionales, tales como etapas para el aislamiento, separación, selección, activación o estimulación, transducción, lavado, suspensión, dilución, concentración y/o formulación de las células. En algunos casos, los métodos de generación o producción de células modificadas genéticamente, p. ej., linfocitos T CD4+ modificados genéticamente y/o linfocitos T CD8+ modificados genéticamente, incluyen uno o más de aislar células de un sujeto, preparar, procesar, incubar en condiciones de estimulación, y/o modificación genética (p. ej., transducción) de las células. En algunos casos, el método incluye etapas de procesamiento realizadas en un orden en el cual: las células de entrada, p. ej., las células primarias, se aíslan primero, tal como por selección o separación, de una muestra biológica; las células de entrada se incuban en condiciones de estimulación, con partículas vectoriales, p. ej., partículas de vector vírico, para introducir un polinucleótido recombinante en las células, p. ej., mediante transducción o transfección; cultivar las células modificadas genéticamente, p. ej., células transducidas, tal como para expandir las células; y recoger, cosechar y/o llenar un recipiente con la totalidad o una parte de las células para formular las células en una composición de salida. En algunos casos, las células de la composición de salida generada se reintroducen en el mismo sujeto, antes o después de la criopreservación. En algunos casos, las composiciones de salida de las células modificadas genéticamente son adecuadas para su uso en una terapia, p. ej., una terapia de células autólogas.

En casos particulares, los métodos divulgados se utilizan con relación a la generación de composiciones de salida de células que expresan un receptor recombinante a partir de una composición de células inicial o de entrada. En algunos casos, la composición de células es una composición de linfocitos T enriquecidos, de linfocitos T CD4+ enriquecidos y/o de linfocitos T CD8+ enriquecidos (en lo sucesivo también denominadas composiciones de linfocitos T enriquecidos, composiciones de linfocitos T CD4+ enriquecidos y composiciones de linfocitos T CD8+ enriquecidos, respectivamente). En algunos casos, los métodos divulgados se utilizan con relación a uno o más de: activar o estimular una composición de células enriquecida con linfocitos T; modificar genéticamente una composición de linfocitos T enriquecidos, p. ej., introducir un polinucleótido que codifique una proteína recombinante mediante transducción o transfección; y/o cultivar la composición modificada genéticamente de linfocitos T enriquecidos, p. ej., en condiciones que promueven la proliferación y/o expansión. En determinados casos, los métodos también pueden utilizarse con relación al aislamiento o la selección de células a partir de una muestra biológica para generar una composición de linfocitos T enriquecidos de entrada, tal como de una muestra biológica tomada, recogida y/u obtenida de un sujeto. En casos particulares, los métodos divulgados pueden utilizarse con relación a la cosecha, recogida y/o formulación de composiciones de linfocitos T enriquecidos después de que las células hayan sido incubadas, activadas, estimuladas, modificadas genéticamente, transducidas, transfectadas y/o cultivadas.

En algunos casos, los métodos divulgados se utilizan con relación al aislamiento, separación, selección, activación o estimulación, transducción, lavado, suspensión, dilución, concentración y/o formulación de una única composición de linfocitos T enriquecidos. En algunos casos, la composición de linfocitos T enriquecidos es una composición de células que incluye linfocitos T CD4+ enriquecidos. En determinados casos, la composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos contiene al menos 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 %, o 99,9 % de linfocitos T CD4+. En casos particulares, la composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos contiene un 100 % de linfocitos T CD4+ o contiene aproximadamente un 100 % de linfocitos T CD4+. En determinados casos, la composición de linfocitos T enriquecidos incluye o contiene menos del 20 %, menos del 10 %, menos del 5 %, menos del 1 %, menos del 0,1 %, o menos del 0,01 % de linfocitos T CD8+, y/o no contiene linfocitos T CD8+, y/o está exenta o sustancialmente exenta de linfocitos T CD8+. En algunos casos, las poblaciones de células consisten esencialmente en linfocitos T CD4+.

En algunos casos, los métodos divulgados se utilizan con relación a la generación de dos o más composiciones de linfocitos T enriquecidos de salida separadas. En algunos casos, los métodos divulgados se realizan por separado en dos o más composiciones de linfocitos T enriquecidos separadas, p. ej., una o más composiciones de linfocitos T CD4+ enriquecidos separadas y una o más composiciones de linfocitos T CD8+ enriquecidos separadas. En determinados casos, los métodos pueden utilizarse con relación a la activación y/o estimulación por separado de dos o más composiciones de linfocitos T enriquecidos; diseñando por separado dos o más composiciones de linfocitos T enriquecidos; y/o cultivar por separado dos o más composiciones de linfocitos T enriquecidos. En determinados casos, los métodos también pueden utilizarse con relación al aislamiento o la selección de diferentes células de una muestra biológica para generar una composición de linfocitos T enriquecidos de entrada separada, tal como composiciones de linfocitos T CD4+ enriquecidos y linfocitos T CD8+ enriquecidos. En casos particulares, los métodos divulgados pueden utilizarse con relación a la cosecha por separado, recogida y/o formulación de composiciones de linfocitos T enriquecidos separadas después de que los linfocitos T hayan sido incubados, activados, estimulados, modificados genéticamente, transducidos, transfectados y/o cultivados.

En determinados casos, los métodos pueden utilizarse con relación a la incubación por separado de al menos una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos separada y al menos una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos separada; activación y/o estimulación por separado de la al menos una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos separada y la al menos una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos separada tras la incubación; separación mediante modificación genética, transducción y/o transfección de la al menos una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos separada y la al menos una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos separada tras la activación y/o estimulación; cultivo por separado de la al menos una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos separada y la al menos una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos separada después de la modificación genética, transducción y/o transfección; la cosecha y/o recogida por separado de la al menos una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos separada y la al menos una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos separada tras el cultivo; la formulación por separado de la al menos una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos separada y la al menos una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos separada tras la cosecha y/o recogida; y/o la administración por separado de las composiciones formuladas a un sujeto que las necesite.

En algunos casos, las dos o más composiciones de linfocitos T enriquecidos separadas incluyen una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos. En determinados casos, las dos o más composiciones separadas incluyen linfocitos T CD8+. En algunos casos, las dos o más composiciones separadas incluyen una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos y una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos. En casos particulares, se originó una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos separada y una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos separada, p. ej., inicialmente aisladas, seleccionadas y/o enriquecidas, a partir de la misma muestra biológica, tal como la misma muestra biológica obtenida, recogida y/o tomada de un único sujeto. En algunos casos, la misma muestra biológica se somete primero a una selección de linfocitos T CD4+, donde se retienen tanto las fracciones negativas como las positivas, y la fracción negativa se somete además a selección de linfocitos T CD8+. En otros casos, la misma muestra biológica se somete primero a una selección de linfocitos T CD8+, donde se retienen tanto las fracciones negativas como las positivas, y la fracción negativa se somete además a selección de linfocitos T CD4+.

- En algunos casos, la composición de linfocitos T enriquecidos es una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos. En determinados casos, la composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos contiene al menos 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 %, o 99,9 % de linfocitos T CD8+, o contiene o contiene aproximadamente 100 % de linfocitos T CD8+. En determinados casos, la composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos incluye o contiene menos del 20 %, menos del 10 %, menos del 5 %, menos del 1 %, menos del 0,1 %, o menos del 0,01 % de linfocitos T CD4+, y/o no contiene linfocitos T CD4+, y/o está exenta o sustancialmente exenta de linfocitos T CD4+. En algunos casos, las poblaciones de células consisten esencialmente en linfocitos T CD8+.
- 10 En algunos casos, una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos y/o una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos modificados genéticamente, se incuba, activa, estimula, modifica genéticamente, transduce, transfecta y/o cultiva con y/o en presencia de IL-2 recombinante. En casos particulares, los métodos se utilizan con relación a la incubación de una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos de entrada en condiciones de estimulación con y/o en presencia de IL-2 recombinante. En algunos casos, los métodos se utilizan con relación al cultivo de una
- 15 composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos modificada genéticamente en condiciones que promueven la proliferación y/o expansión con y/o en presencia de IL-2 recombinante.
- En algunos casos, incubar las composiciones de linfocitos T enriquecidos de entrada en condiciones de estimulación es o incluye incubar las células con un reactivo estimulador, p. ej., un reactivo estimulador descrito en la Sección I-B-
- 20 1. En determinados casos, el reactivo estimulador se elimina o separa de las células antes de una etapa de cultivo. En determinados casos, el reactivo estimulador se elimina o se separa de las células después de la modificación genética, p. ej., transfección o transducción. En algunos casos, el reactivo estimulador se elimina de las células en un tiempo determinado desde el comienzo o el inicio de la incubación con el reactivo estimulador, p. ej., en un plazo de 7 días o menos desde el comienzo o el inicio de la incubación. En casos particulares, la incubación en condiciones de
- 25 estimulación se realiza en presencia de uno o más antioxidantes, p. ej., un antioxidante que contenga azufre y/o un precursor del glutatión.
- En casos particulares, las composiciones de linfocitos T enriquecidos, p. ej., composiciones de linfocitos T enriquecidos estimuladas, en presencia de un policatión, por ejemplo, para mejorar la eficacia de la transfección o la transducción. En determinados casos, el policatión está presente en una cantidad y/o concentración baja y/o
- 30 relativamente baja.
- En determinados casos, al menos una parte de la etapa de cultivo se realiza con mezcla y/o perfusión constantes, p. ej., con un biorreactor en un sistema cerrado. En determinados casos, la mezcla y/o perfusión incorpora una
- 35 sustitución constante y/o gradual de medios o soluciones celulares usados o viejos por medios o soluciones frescos. En casos particulares, las células se cultivan en presencia de un tensioactivo y/o un agente que reduce o impide el cizallamiento celular, tal como el cizallamiento durante el mezclado y/o la perfusión constantes.
- En algunos casos, los métodos divulgados se llevan a cabo de tal manera que una, más, o todas las etapas de la
- 40 preparación de células para uso clínico, p. ej., en terapia celular adoptiva, se llevan a cabo sin exponer las células a condiciones no estériles. En algunos casos de dicho proceso, las células se aíslan, se separan o seleccionan, se transducen, lavan, opcionalmente se activan o estimulan y se formulan, todo dentro de un sistema cerrado. En algunos casos, una o más de las etapas se llevan a cabo fuera del sistema o dispositivo cerrado. En algunos de dichos casos, las composiciones de células enriquecidas se transfieren aparte del sistema o dispositivo cerrado en condiciones
- 45 estériles, tal como, mediante transferencia estéril a un sistema cerrado separado.
- En casos particulares, las composiciones de linfocitos T enriquecidos, formuladas para crioprotección, criocongelado, y/o almacenadas por debajo de 0 °C, por debajo de -20 °C, o a o por debajo de -70 °C o -80 °C antes de, durante, o
- 50 después de cualquier fase o etapa del proceso se pueden recoger para generar composiciones de linfocitos T enriquecidos de salida que expresen receptores recombinantes. En algunos casos, las células pueden almacenarse durante un periodo de tiempo inferior a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días, o durante un periodo de tiempo inferior a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 semanas, o durante un periodo de tiempo de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 semanas, o durante más de 8 semanas. Después del almacenamiento, las composiciones de linfocitos T enriquecidos pueden descongelarse y el procesamiento puede reanudarse desde el mismo punto del proceso. En algunos casos, las composiciones de
- 55 linfocitos T enriquecidos de entrada se criocongelan y conservan antes de su procesamiento posterior, p. ej., incubación en condiciones de estimulación. En casos particulares, las composiciones cultivadas y/o formuladas de linfocitos T enriquecidos se criocongelan y conservan antes de ser administradas al sujeto, p. ej., como terapia celular autóloga.
- En determinados casos, las composiciones de células de linfocitos T enriquecidos separadas se combinan en una
- 60 única composición. Por ejemplo, en algunos casos, una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos se combina con una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos en una única composición de linfocitos T CD4+ y CD8+ enriquecidos. En determinados casos, las distintas composiciones originadas fueron, p. ej., inicialmente aisladas, seleccionadas y/o enriquecidas, a partir de la misma muestra biológica, tal como la misma muestra biológica obtenida,
- 65 recogida y/o tomada de un único sujeto. En algunos casos, las composiciones separadas se procesan por separado en una o más etapas o fases de un proceso para generar composiciones de salida, p. ej., un proceso con relación a



los métodos divulgados. En algunos casos, las composiciones separadas pueden combinarse en una única composición antes de, durante o después de cualquier etapa o fase del proceso de generación de composiciones de salida. Así, en algunos casos, las composiciones de entrada separadas, estimuladas, modificadas genéticamente, cultivadas, formuladas y/o cosechadas de linfocitos T enriquecidos de la misma muestra biológica se combinan en una

5 única composición y, en determinados casos, se procesan posteriormente como una única composición. En determinados casos, las composiciones de células enriquecidas de salida separadas se combinan en una única composición de salida antes de administrar las células a un sujeto.

10 En determinados casos, en cualquier fase o etapa del proceso, se puede muestrear o recoger una porción de las células, p. ej., puede extraerse de la composición de linfocitos T enriquecidos mientras la composición permanece en el sistema cerrado, tal como durante el aislamiento, incubación, modificación genética, cultivo y/o formulación. En determinados casos, dichas células pueden ser analizadas para determinar marcadores, rasgos distintivos o características que incluyen, pero sin limitación, viabilidad, apoptosis, activación, estimulación, crecimiento y/o agotamiento. En algunos casos, las células se muestrean o recogen mediante un proceso automatizado mientras que

15 la composición de linfocitos T enriquecidos permanece en el sistema cerrado. En algunos casos, el análisis de las células muestreadas o recogidas está automatizado. En casos particulares, el análisis se realiza en un sistema cerrado en condiciones estériles.

20 En algunos casos, las células o composiciones de células producidas y/o procesadas mediante los métodos descritos pueden compararse con células o composiciones de células procesadas o producidas mediante un proceso ilustrativo y/o alternativo. En algunos casos, el proceso alternativo y/o ilustrativo puede diferir en uno o más casos específicos, pero, por lo demás, contiene similares o los mismos rasgos distintivos, casos, etapas, fases, reactivos y/o condiciones del caso similares o iguales al caso de los métodos divulgados que se comparan. Por ejemplo, cuando los métodos divulgados se utilizan con relación a la incubación de células en presencia de un reactivo, dichas células pueden

25 compararse con células no incubadas con el reactivo en un proceso ilustrativo y/o alternativo. En algunos casos, salvo que se indique lo contrario, los métodos divulgados y el proceso ilustrativo y/o alternativo habrían sido por lo demás similares a y/o idénticos, tal como, a etapas similares o idénticas para aislar, seleccionar, enriquecer, activar, estimular, modificación genética, transfectar, transducir, cultivar y/o formular. En algunos casos, salvo que se indique lo contrario, los métodos divulgados y el proceso alternativo aíslan, seleccionan y/o enriquecen células del mismo tipo o de tipos

30 similares de muestras biológicas y/o procesan células y/o células de entrada del mismo tipo celular.

También se divulgan células y composiciones preparadas mediante los métodos, incluyendo composiciones y formulaciones farmacéuticas y kits, sistemas y dispositivos para realizar los métodos. También se divulgan métodos para el uso de las células y composiciones preparadas mediante los métodos, incluyendo métodos terapéuticos, tales

35 como métodos para terapia celular adoptiva y composiciones farmacéuticas para la administración a sujetos.

#### A. Muestras y preparaciones celulares

40 En casos particulares, los métodos divulgados se utilizan con relación al aislamiento, selección y/o enriquecimiento de células de una muestra biológica para generar una o más composiciones de células enriquecidas de entrada, p. ej., linfocitos T. En algunos casos, los métodos divulgados incluyen el aislamiento de células o composiciones de las mismas a partir de muestras biológicas, tales como las obtenidas o derivadas de un sujeto, tal como uno que tiene una enfermedad o afección particular o que necesita una terapia celular o al que se le administrará una terapia celular. En algunos casos, el sujeto es un ser humano, tal como un sujeto que es un paciente que necesita una intervención

45 terapéutica particular, tal como la terapia celular adoptiva para la que se aíslan, se procesan y/o se diseñan genéticamente. En consecuencia, las células en algunos casos son células primarias, p. ej., células humanas primarias. Las muestras incluyen tejido, líquido y otras muestras tomadas directamente del sujeto. La muestra biológica puede ser una muestra obtenida directamente de una fuente biológica o una muestra que se procesa. Las muestras biológicas incluyen, pero no se limitan a, líquidos corporales, tales como sangre, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, orina y sudor, muestras de tejidos y órganos, incluidas las muestras procesadas obtenidas de los mismos.

50 En algunos casos, la muestra es sangre o una muestra derivada de sangre, o es o deriva de un producto de aféresis o leucocitaféresis. Las muestras de ejemplo incluyen sangre completa, células mononucleares de sangre periférica (CMSP), leucocitos, médula ósea, timo, biopsia de tejido, tumor, leucemia, linfoma, ganglio linfático, tejido linfóide asociado al intestino, tejido linfóide asociado a mucosas, bazo, otros tejidos linfoides, hígado, pulmón, estómago, intestino, colon, riñón, páncreas, mama, hueso, próstata, cuello del útero, testículos, ovarios, amígdala u otro órgano y/o células derivadas de los mismos. Las muestras incluyen, en el contexto de la terapia celular, p. ej., terapia celular adoptiva, muestras de fuentes autólogas y alogénas.

60 En algunos ejemplos, se obtienen células de la sangre en circulación de un sujeto, p. ej., mediante aféresis o leucocitaféresis. Las muestras, en algunos casos, contienen linfocitos, incluyendo linfocitos T, monocitos, granulocitos, linfocitos B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y/o plaquetas, y, en algunos casos, contienen células distintas de glóbulos rojos y plaquetas.

65 En algunos casos, las células sanguíneas recogidas del sujeto se lavan, p. ej., para eliminar la fracción de plasma y

colocar las células en un tampón o medio adecuado para las etapas de procesamiento posteriores. En algunos casos, las células se lavan con solución salina tamponada con fosfato (PBS). En algunos casos, la solución de lavado carece de calcio y/o magnesio y/o muchos o todos los cationes divalentes. En algunos casos, una etapa de lavado se lleva a cabo en una centrífuga de "flujo continuo" semiautomática (por ejemplo, el procesador de células Cobe 2991, Baxter) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En algunos casos, una etapa de lavado se logra mediante filtración de flujo tangencial (TFF) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En algunos casos, las células se resuspenden en una diversidad de tampones biocompatibles después del lavado, tal como, por ejemplo, PBS sin  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ . En determinados casos, los componentes de una muestra de células sanguíneas se eliminan y las células se resuspenden directamente en el medio de cultivo.

En algunos casos, los métodos de preparación incluyen etapas para congelar, p. ej., crioconservar, las células, ya sea antes o después del aislamiento, selección y/o enriquecimiento y/o incubación para transducción y modificación genética, y/o después del cultivo y/o cosecha de las células modificadas genéticamente. En algunos casos, la etapa de congelación y descongelación posterior elimina los granulocitos y, hasta cierto punto, los monocitos en la población celular. En algunos casos, las células se suspenden en una solución de congelación, p. ej., después de una etapa de lavado para eliminar el plasma y las plaquetas. En algunos casos puede usarse cualquiera de una diversidad de soluciones y parámetros de congelación. En algunos casos, las células se congelan, p. ej., criocongelan o crioconservan, en medios y/o solución con una concentración final de o aproximadamente el 12,5 %, 12,0 %, 11,5 %, 11,0 %, 10,5 %, 10,0 %, 9,5 %, 9,0 %, 8,5 %, 8,0 %, 7,5 %, 7,0 %, 6,5 %, 6,0 %, 5,5 %, o 5,0 % de DMSO, o entre el 1 % y el 15 %, entre el 6 % y el 12 %, entre el 5 % y el 10 %, o entre el 6 % y el 8 % de DMSO. En casos particulares, las células se congelan, p. ej., criocongelan o crioconservan, en medios y/o solución con una concentración final de o aproximadamente el 5,0 %, 4,5 %, 4,0 %, 3,5 %, 3,0 %, 2,5 %, 2,0 %, 1,5 %, 1,25 %, 1,0 %, 0,75 %, 0,5 %, o 0,25 % de HSA, o entre el 0,1 % y - 5 %, entre el 0,25 % y el 4 %, entre el 0,5 % y el 2 %, o entre el 1 % y el 2 % de HSA. Un ejemplo implica el uso de PBS que contiene DMSO al 20 % y albúmina sérica humana (HSA, por sus siglas en inglés) al 8 % u otros medios de congelación de células adecuados. Esto después se diluye a 1:1 con medio de manera que la concentración final de DMSO y HSA sea del 10 % y del 4 %, respectivamente. Después, las células generalmente se congelan a o aproximadamente  $-80^{\circ}\text{C}$  a una velocidad de  $1^{\circ}$  por minuto y se conservan en la fase de vapor de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido.

En algunos casos, el aislamiento de las células o poblaciones incluye una o más etapas de preparación y/o separación de células no basada en afinidad. En algunos ejemplos, las células se lavan, se centrifugan y/o se incuban en presencia de uno o más reactivos, por ejemplo, para eliminar componentes no deseados, enriquecer en componentes deseados, lisar o eliminar las células sensibles a reactivos particulares. En algunos ejemplos, las células se separan en función de una o más propiedades, tales como densidad, propiedades adherentes, tamaño, sensibilidad y/o resistencia a componentes particulares. En algunos casos, los métodos incluyen métodos de separación celular basados en la densidad, tales como la preparación de glóbulos blancos a partir de sangre periférica mediante la lisis de los glóbulos rojos y la centrifugación a través de un gradiente de Percoll o Ficoll.

En algunos casos, al menos una parte de la etapa de selección incluye la incubación de las células con un reactivo de selección. La incubación con un reactivo o reactivos de selección, p. ej., como parte de métodos de selección que pueden realizarse utilizando uno o más reactivos de selección para la selección de uno o más tipos celulares diferentes basados en la expresión o presencia en o sobre la célula de una o más moléculas específicas, tales como marcadores de superficie, p. ej., proteínas de superficie, marcadores intracelulares o ácido nucleico. En algunos casos, puede utilizarse cualquier método conocido que utilice un reactivo o reactivos de selección para la separación basada en dichos marcadores. En algunos casos, el reactivo o reactivos de selección dan lugar a una separación basada en la afinidad o inmutafinidad. Por ejemplo, la selección en algunos casos incluye la incubación con un reactivo o reactivos para la separación de células y poblaciones celulares basándose en la expresión de las células o el nivel de expresión de uno o más marcadores, normalmente marcadores de superficie celular, por ejemplo, mediante incubación con un anticuerpo o un compañero de unión que se une específicamente a dichos marcadores, seguido generalmente de etapas de lavado y separación de las células que se han unido al anticuerpo o al compañero de unión, de aquellas células que no se han unido al anticuerpo o al compañero de unión.

En algunos casos de estos procesos, se mezcla un volumen de células con una cantidad de un reactivo de selección basada en la afinidad deseado. La selección basada en la inmutafinidad puede llevarse a cabo utilizando cualquier sistema o método que dé lugar a una interacción energética favorable entre las células que se separan y la molécula que se une específicamente al marcador de la célula, p. ej., el anticuerpo u otro compañero de unión en la superficie sólida, p. ej., partícula. En algunos casos, los métodos se llevan a cabo utilizando partículas tales como perlas, p. ej., perlas magnéticas, que están recubiertas con un agente de selección (p. ej., un anticuerpo) específico del marcador de las células. Las partículas (p. ej., perlas) pueden incubarse o mezclarse con células en un recipiente, tal como un tubo o una bolsa, mientras se agita o mezcla, con una relación constante de densidad celular-partícula (p. ej., perlas) para ayudar a promover las interacciones energéticamente favorecidas. En otros casos, los métodos incluyen la selección de células en los que toda o una parte de la selección se lleva a cabo en la cavidad interna de una cámara centrífuga, por ejemplo, con rotación centrífuga. En algunos casos, la incubación de las células con reactivos de selección, tales como los reactivos de selección basados en la inmutafinidad, se realiza en una cámara centrífuga. En determinados casos, el aislamiento o separación se realiza usando un sistema, dispositivo o aparato descrito en la Solicitud Internacional de Patente, Número de publicación WO2009/072003 o US 20110003380 A1. En un ejemplo, el

sistema es un sistema como el descrito en la publicación internacional número WO2016/073602.

- En algunos casos, realizando dichas etapas de selección o partes de las mismas (p. ej., incubación con partículas recubiertas de anticuerpos, p. ej., perlas magnéticas) en la cavidad de una cámara centrífuga, el usuario puede
- 5 controlar determinados parámetros, tales como el volumen de varias soluciones, adición de solución durante el procesado y momento de la misma, que puede aportar ventajas frente a otros métodos disponibles. Por ejemplo, la capacidad de disminuir el volumen de líquido en la cavidad durante la incubación puede aumentar la concentración de las partículas (p. ej., el reactivo de perlas) utilizadas en la selección y, por tanto, el potencial químico de la solución, sin afectar al número total de células de la cavidad. Esto, a su vez, puede potenciar las interacciones por pares entre
- 10 las células que se procesan y las partículas utilizadas para la selección. En algunos casos, realizar la etapa de incubación en la cámara, p. ej., cuando se asocian a los sistemas, circuitos y control como se describe en el presente documento, permite al usuario agitar la solución en el momento o momentos deseados durante la incubación, que también puede mejorar la interacción.
- 15 En algunos casos, al menos una parte de la etapa de selección se realiza en una cámara centrífuga, que incluye la incubación de las células con un reactivo de selección. En algunos casos de estos procesos, un volumen de células se mezcla con una cantidad de un reactivo de selección basado en la afinidad deseado que es mucho menor que el que se emplea normalmente al realizar selecciones similares en un tubo o recipiente para la selección del mismo número de células y/o volumen de células según las instrucciones del fabricante. En algunos casos, se emplea una
- 20 cantidad de reactivo o reactivos de selección que no sea más del 5 %, no más del 10 %, no más del 15 %, no más del 20 %, no más del 25 %, no más del 50 %, no más del 60 %, no más del 70 % o no más del 80 % de la cantidad del mismo reactivo o reactivos de selección empleados para la selección de células en una incubación basada en tubos o recipientes para el mismo número de células y/o el mismo volumen de células según las instrucciones del fabricante.
- 25 En algunos casos, para la selección, p. ej., la selección de las células basada en la inmunoafinidad, las células se incuban en la cavidad de la cámara en una composición que también contiene el tampón de selección con un reactivo de selección, tal como una molécula que se une específicamente a un marcador de superficie en una célula que se desea enriquecer y/o agotar, pero no en otras células de la composición, tal como un anticuerpo, que opcionalmente se acopla a un andamio tal como un polímero o una superficie, p. ej., perla, p. ej., perla magnética, tal como perlas magnéticas acopladas a anticuerpos monoclonales específicos de CD4 y CD8. En algunos casos, como se describe,
- 30 el reactivo de selección se añade a las células en la cavidad de la cámara en una cantidad que es sustancialmente inferior a (p. ej., no es superior al 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 % u 80 % de la cantidad) en comparación con la cantidad del reactivo de selección que se utiliza habitualmente o que sería necesaria para lograr aproximadamente la misma o similar eficacia de selección del mismo número de células o del mismo volumen de células cuando la selección se realiza en un tubo con agitación o rotación. En algunos casos, la incubación se realiza con la adición de un tampón de selección a las células y al reactivo de selección para lograr un volumen objetivo con incubación del reactivo de, por ejemplo, 10 ml a 200 ml, tal como al menos o aproximadamente 10 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml, 50 ml, 60 ml, 70 ml, 80 ml, 90 ml, 100 ml, 150 ml o 200 ml. En algunos casos, el tampón de selección y el reactivo de selección se mezclan previamente antes de añadirlos a las células. En algunos casos, el tampón de
- 40 selección y el reactivo de selección se añaden por separado a las células. En algunos casos, la incubación de selección se lleva a cabo en condiciones periódicas de mezcla suave, que puede ayudar a promover interacciones energéticamente favorecidas y, por tanto, permitir el uso de menos reactivos de selección en general, logrando al mismo tiempo una alta eficiencia de selección.
- 45 En algunos casos, la duración total de la incubación con el reactivo de selección es de 5 minutos a 6 horas o de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 6 horas, tal como de 30 minutos a 3 horas, por ejemplo, al menos o aproximadamente al menos 30 minutos, 60 minutos, 120 minutos o 180 minutos.
- En algunos casos, la incubación se realiza generalmente en condiciones de mezcla, tal como en presencia de rotación, generalmente a una fuerza o velocidad relativamente bajas, tal como una velocidad inferior a la utilizada para granular las células, tal como de 600 rpm a 1700 rpm o de aproximadamente 600 rpm a aproximadamente 1700 rpm (p. ej., a o aproximadamente o al menos 600 rpm, 1000 rpm, o 1500 rpm o 1700 rpm), tal como a una FCR en la muestra o en la pared de la cámara u otro recipiente de 80 g a 100 g o de aproximadamente 80 g a aproximadamente 100 g (p. ej., a o aproximadamente o al menos 80 g, 85 g, 90 g, 95 g o 100 g). En algunos casos, el giro se realiza mediante
- 50 intervalos repetidos de un giro a una velocidad tan baja seguido de un periodo de descanso, tal como un giro y/o descanso durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 segundos, tal como un giro de aproximadamente 1 o 2 segundos seguido de un descanso de aproximadamente 5, 6, 7 u 8 segundos.
- En algunos casos, dicho proceso se lleva a cabo dentro del sistema totalmente cerrado del que forma parte la cámara.
- 60 En algunos casos, este proceso (y en algunos casos también una o más etapas adicionales, tal como una etapa previa de lavado de una muestra que contenga las células, tal como una muestra de aféresis) se realiza de forma automatizada, tal que las células, el reactivo y otros componentes se introducen y se extraen de la cámara en los momentos adecuados y se efectúa la centrifugación, para completar la fase de lavado y unión en un único sistema cerrado utilizando un programa automatizado.
- 65 En algunos casos, tras la incubación y/o mezcla de las células y el reactivo y/o reactivos de selección, las células

incubadas se someten a una separación para seleccionar las células en función de la presencia o ausencia del reactivo o reactivos concretos. En algunos casos, la separación se realiza en el mismo sistema cerrado en el cual se realizó la incubación de las células con el reactivo de selección. En algunos casos, tras la incubación con los reactivos de selección, las células incubadas, incluidas las células a las que se ha unido el reactivo de selección se transfieren a un sistema de separación de células basado en la inmunoafinidad. En algunos casos, el sistema de separación basado en la inmunoafinidad es o contiene una columna de separación magnética.

Dichas etapas de separación pueden basarse en una selección positiva, en la cual las células que han unido los reactivos, p. ej., anticuerpo o compañero de unión, se retienen para su uso posterior, y/o selección negativa, en la cual las células que no se han unido al reactivo, p. ej., anticuerpo o compañero de unión, se retienen. En algunos ejemplos, ambas fracciones se conservan para su uso posterior. En algunos casos, la selección negativa puede ser particularmente útil cuando no hay ningún anticuerpo disponible que identifique específicamente un tipo celular en una población heterogénea, de manera que la separación se realiza mejor basándose en marcadores expresados por células distintas de la población deseada.

En algunos casos, las etapas del proceso incluyen además la selección negativa y/o positiva de las células incubadas, tal como el uso de un sistema o aparato que pueda realizar una selección basada en la afinidad. En algunos casos, el aislamiento se realiza mediante el enriquecimiento en una población celular particular mediante selección positiva, o el agotamiento de una población celular particular, por selección negativa. En algunos casos, la selección positiva o negativa se logra incubando células con uno o más anticuerpos u otro agente de unión que se une específicamente a uno o más marcadores de superficie expresados o expresados (marcador+) a un nivel relativamente más alto (marcador<sup>alto</sup>) en las células seleccionadas positiva o negativamente, respectivamente. Se pueden llevar a cabo múltiples rondas de la misma etapa de selección, p. ej., etapa de selección positiva o negativa. En determinados casos, la fracción seleccionada positiva o negativamente sometida al proceso de selección, tal como, repitiendo una etapa de selección positiva o negativa. En algunos casos, la selección se repite dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, seis veces, siete veces, ocho veces, nueve veces o más de nueve veces. En determinados casos, la misma selección se realiza hasta cinco veces. En determinados casos, la misma etapa de selección se realiza tres veces.

No es necesario que la separación dé como resultado un enriquecimiento del 100 % o la eliminación de una población celular particular o células que expresan un marcador particular. Por ejemplo, la selección positiva o el enriquecimiento en células de un tipo particular, tales como las que expresan un marcador, se refiere al aumento del número o porcentaje de dichas células, pero no necesariamente da como resultado una ausencia total de células que no expresan el marcador. Análogamente, la selección negativa, la eliminación o el agotamiento de células de un tipo particular, tales como las que expresan un marcador, se refieren a disminuir el número o porcentaje de dichas células, pero no necesariamente da como resultado la eliminación completa de todas esas células.

En algunos ejemplos, se llevan a cabo múltiples rondas de etapas de separación, donde la fracción seleccionada positiva o negativamente de una etapa se somete a otra etapa de separación, tal como una selección posterior positiva o negativa. En algunos ejemplos, una sola etapa de separación puede agotar las células que expresan múltiples marcadores de manera simultánea, tal como incubando células con una pluralidad de anticuerpos o compañeros de unión, cada uno específico para un marcador dirigido a la selección negativa. Análogamente, pueden seleccionarse simultáneamente múltiples tipos celulares positivamente incubando células con una pluralidad de anticuerpos o compañeros de unión expresados en los diversos tipos celulares. En determinados casos, una o más etapas de separación se repiten y/o se realizan más de una vez. En algunos casos, la fracción seleccionada positiva o negativamente resultante de una etapa de separación se somete a la misma etapa de separación, tal como repitiendo la etapa de selección positiva o negativa. En algunos casos, una sola etapa de separación se repite y/o se realiza más de una vez, por ejemplo, para aumentar el rendimiento de las células seleccionadas positivamente, aumentar la pureza de las células seleccionadas negativamente, y/o eliminar aún más las células seleccionadas positivamente de la fracción seleccionada negativamente. En determinados casos, una o más etapas de separación se realizan y/o repiten dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, seis veces, siete veces, ocho veces, nueve veces, diez veces, o más de diez veces. En determinados casos, la una o más etapas de selección se realizan y/o repiten entre una y diez veces, entre una y cinco veces, o entre tres y cinco veces. En determinados casos, una o más etapas de selección se repiten tres veces.

Por ejemplo, en algunos casos, subpoblaciones específicas de linfocitos T, tal como células positivas o que expresan altos niveles de uno o más marcadores de superficie, p. ej., los linfocitos CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ y/o CD45RO+, se aíslan mediante técnicas de selección positiva o negativa. En algunos casos, dichas células se seleccionan por incubación con uno o más anticuerpos o compañeros de unión que se unen específicamente a dichos marcadores. En algunos casos, se puede conjugar el anticuerpo o el compañero de unión, tal como directa o indirectamente, a un soporte sólido o a una matriz para efectuar la selección, tal como una perla magnética o una perla paramagnética. Por ejemplo, los linfocitos CD3+, CD28+ pueden seleccionarse positivamente utilizando perlas magnéticas conjugadas CD3/CD28 (p. ej., DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T Cell Expander, y/o perlas ExpACT®).

En algunos casos, los linfocitos T se separan de una muestra de CMSP mediante la selección negativa de marcadores expresados en células que no son linfocitos T, tales como linfocitos B, monocitos u otros glóbulos blancos, tales como

CD14. En algunos casos, se usa una etapa de selección de CD4+ o CD8+ para separar linfocitos T CD4+ colaboradores y linfocitos T CD8+ citotóxicos. Tales poblaciones de CD4+ y CD8+ se pueden clasificar a su vez en subpoblaciones mediante la selección positiva o negativa de los marcadores expresados o expresados en un grado relativamente mayor en una o más subpoblaciones de linfocitos T indiferenciados, de memoria, y/o efectores.

En algunos casos, los linfocitos T CD8+ se enriquecen aún más o se reducen las células indiferenciadas, de memoria central, memoria efectora, y/o células madre de memoria central, tal como mediante selección positiva o negativa basándose en antígenos de superficie asociados a la subpoblación respectiva. En algunos casos, el enriquecimiento en linfocitos T de memoria central (TCM) se realiza para aumentar la eficacia, tal como para mejorar la supervivencia a largo plazo, la expansión y/o el injerto después de la administración, que, en algunos casos, es particularmente robusta en dichas subpoblaciones. Véase Terakura *et al.*, (2012) Blood.1:72-82; Wang *et al.* (2012) J Immunother. 35(9):689-701. En algunos casos, combinar linfocitos TCD8+ y linfocitos T CD4+ enriquecidos en TCM mejora aún más su eficacia.

En unos casos, los linfocitos T de memoria están presentes en los subconjuntos CD62L+ y CD62L- de linfocitos CD8+ de sangre periférica. Las CMSP pueden enriquecerse o agotarse en las fracciones CD62L-CD8+ y/o CD62L+CD8+, tales como el uso de anticuerpos anti-CD8 y anti-CD62L.

En algunos casos, el enriquecimiento en linfocitos T de memoria central (TCM) se basa en una expresión de superficie alta o positiva de CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 y/o CD 127; en algunos casos, se basa en la selección negativa de células que expresan o expresan altos niveles de CD45RA y/o granzima B. En algunos casos, el aislamiento de una población de CD8+ enriquecidos en células TCM se lleva a cabo mediante el agotamiento de las células que expresan CD4, CD14, CD45RA y la selección positiva o enriquecimiento en células que expresan CD62L. En un caso, el enriquecimiento en linfocitos T de memoria central (TCM) se lleva a cabo a partir de una fracción negativa de células seleccionadas en función de la expresión de CD4, que se somete a una selección negativa basada en la expresión de CD14 y CD45RA, y una selección positiva basada en CD62L.

En algunos casos, dichas selecciones se realizan simultáneamente y en otros casos se realizan secuencialmente, en cualquier orden. En algunos casos, la misma etapa de selección basada en la expresión de CD4 utilizada en la preparación de la población o subpoblación de linfocitos T CD8+, también se usa para generar la población o subpoblación de linfocitos CD4+, de manera que tanto las fracciones positivas como las negativas de la separación basada en CD4 se conserven y usen en las etapas posteriores de los métodos, opcionalmente después de una o más etapas de selección positiva o negativa adicionales. En algunos casos, la selección de la población de linfocitos T CD4+ y la selección de la población de linfocitos T CD8+ se realizan simultáneamente. En algunos casos, la selección de la población de linfocitos T CD4+ y la selección de la población de linfocitos T CD8+ se realizan secuencialmente, en cualquier orden. En algunos casos, los métodos de selección de células pueden incluir los descritos en la solicitud n.º US20170037369 publicada. En algunos casos, la población de linfocitos T CD4+ seleccionada y la población de linfocitos T CD8+ seleccionada pueden combinarse después de la selección. En algunos casos, la población de linfocitos T CD4+ seleccionada y la población de linfocitos T CD8+ seleccionada pueden combinarse en una bolsa de biorreactor como se describe en el presente documento. En algunos casos, la población de linfocitos T CD4+ seleccionada y la población de linfocitos T CD8+ seleccionada se procesan por separado, de modo que la población de linfocitos T CD4+ seleccionada se enriquece en linfocitos T CD4+ y se incuba con un reactivo estimulador (p. ej., perlas magnéticas anti-CD3/anti-CD28), se transduce con un vector vírico que codifica una proteína recombinante (p. ej., CAR) y se cultiva en condiciones para expandir los linfocitos T y la población de linfocitos T CD8+ seleccionada se enriquece en linfocitos T CD8+ y se incuba con un reactivo estimulador (p. ej., perlas magnéticas anti-CD3/anti-CD28), se transduce con un vector vírico que codifica una proteína recombinante (p. ej., CAR), tal como la misma proteína recombinante que para la modificación genética de los linfocitos T CD4+ del mismo donante, y cultivados en condiciones para expandir los linfocitos T, de acuerdo con los métodos divulgados.

En casos particulares, una muestra biológica, p. ej., una muestra de CMSP u otros glóbulos blancos, se someten a la selección de linfocitos T CD4+, en donde se conservan las fracciones tanto negativas como positivas. En determinados casos, los linfocitos T CD8+ se seleccionan de la fracción negativa. En algunos casos, una muestra biológica se somete a la selección de linfocitos T CD8+, en donde se conservan las fracciones tanto negativas como positivas. En determinados casos, los linfocitos T CD4+ se seleccionan de la fracción negativa.

En un ejemplo particular, una muestra de CMSP u otra muestra de glóbulos blancos se somete a selección de linfocitos CD4+, en donde se conservan las fracciones tanto negativas como positivas. Después, la fracción negativa se somete a una selección negativa basada en la expresión de CD14 y CD45RA o CD19, y a una selección positiva basada en un marcador característico de los linfocitos T de memoria central, tal como CD62L o CCR7, donde las selecciones positivas y negativas se realizan en cualquier orden.

Los linfocitos T CD4+ cooperadores pueden clasificarse en células indiferenciadas, de memoria central y efectoras mediante la identificación de poblaciones celulares que tienen antígenos de superficie celular. Los linfocitos CD4+ se pueden obtener mediante métodos convencionales. En algunos casos, los linfocitos T CD4+ indiferenciados son linfocitos CD45RO-, CD45RA+, CD62L+ o CD4+ T. En algunos casos, los linfocitos T CD4+ de memoria central pueden ser CD62L+ y CD45RO+. En algunos casos, los linfocitos T CD4+ efectoras son CD62L- y CD45RO-.

En un ejemplo, para el enriquecimiento de linfocitos CD4+ por selección negativa, un cóctel de anticuerpos monoclonales normalmente incluye anticuerpos contra CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR y CD8. En algunos casos, el anticuerpo o compañero de unión está unido a un soporte sólido o matriz, tal como una perla magnética o una perla paramagnética, para permitir la separación de células para la selección positiva y/o negativa. Por ejemplo, en algunos casos, las células y las poblaciones celulares se separan o aíslan usando técnicas de separación inmunomagnéticas (o magnéticas por afinidad) (revisadas en *Methods in Molecular Medicine*, vol. 58: *Metastasis Research Protocols*, Vol. 2: *Cell Behavior In Vitro and In Vivo*, p 17-25 Editado por: S. A. Brooks y U. Schumacher © Humana Press Inc., Totowa, NJ).

En algunos casos, la muestra incubada o la composición de células a separar se incuban con un reactivo de selección que contiene material magnetizable o magnéticamente sensible pequeño, tal como partículas o micropartículas magnéticamente sensibles, tales como perlas paramagnéticas (p. ej., tal como perlas Dynabeads o MACS®). El material magnéticamente sensible, p. ej., partícula, generalmente está unido directa o indirectamente a un compañero de unión, p. ej., un anticuerpo, que se une específicamente a una molécula, p. ej., un marcador de superficie, presente en la célula, células, o población de células que se desea separar, p. ej., que se desea seleccionar negativa o positivamente.

En algunos casos, la partícula o perla magnética comprende un material magnéticamente sensible unido a un compañero de unión específico, tal como un anticuerpo u otro compañero de unión. Se conocen muchos materiales magnéticamente sensibles para su uso en métodos de separación magnética, p. ej., los descritos en Molday, Patente US-4.452.773 y en la memoria descriptiva de la patente europea EP 452342 B. También se pueden utilizar partículas de tamaño coloidal, tales como las descritas en Owen patente US-4.795.698 y Liberti *et al.*, Patente US-5.200.084.

La incubación generalmente se realiza en condiciones en las que los anticuerpos o compañeros de unión, o moléculas, tales como anticuerpos secundarios u otros reactivos, que se unen específicamente a dichos anticuerpos o miembros de unión, que están adheridos a la partícula o perla magnética, se unen específicamente a las moléculas de la superficie celular si están presentes en las células dentro de la muestra.

En determinados casos, las partículas magnéticamente sensibles están recubiertas de anticuerpos primarios u otros compañeros de unión, anticuerpos secundarios, lectinas, enzimas o estreptavidina. En determinados casos, las partículas magnéticas se unen a las células a través de un recubrimiento de anticuerpos primarios específicos para uno o más marcadores. En determinados casos, las células, en lugar de las perlas, se marcan con un anticuerpo primario o un compañero de unión, y después se añaden partículas magnéticas recubiertas con un anticuerpo secundario específico del tipo celular u otro compañero de unión (por ejemplo, estreptavidina). En determinados casos, las partículas magnéticas recubiertas con estreptavidina se usan con relación a anticuerpos primarios o secundarios biotinilados.

En algunos casos, la separación se logra en un procedimiento en el cual la muestra se coloca en un campo magnético, y aquellas células que tienen partículas magnéticamente sensibles o magnetizables unidas a las mismas serán atraídas al imán y se separarán de las células sin marcar. Para la selección positiva, se retienen las células que son atraídas por el imán; para la selección negativa, se retienen las células que no son atraídas (células sin marcar). En algunos casos, se realiza una combinación de selección positiva y negativa durante la misma etapa de selección, donde se retienen las fracciones positivas y negativas y se procesan adicionalmente o se someten a etapas de separación adicionales.

En algunos casos, la selección basada en la afinidad se realiza mediante clasificación de células activadas magnéticamente (MACS) (Miltenyi Biotech, Auburn, CA). clasificación de células activadas magnéticamente (MACS), p. ej., los sistemas CliniMACS son capaces de realizar una selección de gran pureza de las células que tienen partículas magnetizadas adheridas. En determinados casos, los MACS funcionan en un modo en donde las especies diana y no diana se eluyen de manera secuencial después de la aplicación del campo magnético externo. Es decir, las células unidas a las partículas magnetizadas se mantienen en su lugar mientras se eluyen las especies no unidas. Posteriormente, después de que se complete esta primera etapa de elución, las especies que quedaron atrapadas en el campo magnético y se impidió que eluyesen se liberan de alguna manera, de manera que pueden eluirse y recuperarse. En determinados casos, las células no diana se marcan y la población heterogénea de células se empobrece en las mismas.

En algunos casos, las partículas magnéticamente sensibles se dejan unidas a las células que se incubarán, cultivarán y/o modificarán genéticamente; en algunos casos, las partículas se dejan unidas a las células para la administración a un paciente. En algunos casos, las partículas magnetizables o magnéticamente sensibles se eliminan de las células. Se conocen métodos para eliminar partículas magnetizables de las células e incluyen, p. ej., el uso de anticuerpos no marcados competidores, partículas magnetizables o anticuerpos conjugados con enlazadores escindibles, etc. En algunos casos, las partículas magnetizables son biodegradables.

En algunos casos, el aislamiento y/o la selección dan como resultado una o más composiciones de linfocitos T enriquecidos de entrada, p. ej., linfocitos T CD3+, linfocitos T CD4+ y/o linfocitos T CD8+. En algunos casos, dos o

más composiciones de entrada diferentes se aíslan, se seleccionan, se enriquecen u obtienen a partir de una única muestra biológica. En algunos casos, las composiciones de entrada diferentes se aíslan, se seleccionan, se enriquecen y/u obtienen a partir de muestras biológicas recogidas, tomadas y/u obtenidas por separado del mismo sujeto.

5 En determinados casos, la una o más composiciones de entrada es o incluye una composición de linfocitos T enriquecidos que incluye al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 %, al menos un 99,9 %, o un o aproximadamente un 100 % de linfocitos T CD3+. En casos particulares, la composición  
10 de linfocitos T enriquecidos de entrada consiste esencialmente en linfocitos T CD3+.

En determinados casos, la una o más composiciones de entrada es o incluye una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos que incluye al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 %, al menos un 99,9 %, o un o aproximadamente un 100 % de linfocitos T CD4+. En determinados casos, la  
15 composición de linfocitos T CD4+ de entrada incluye menos del 40 %, menos del 35 %, menos del 30 %, menos del 25 %, menos del 20 %, menos del 15 %, menos del 10 %, menos del 5 %, menos del 1 %, menos del 0,1 %, o menos del 0,01 % de linfocitos T CD8+, y/o no contiene linfocitos T CD8+, y/o está exenta o sustancialmente exenta de linfocitos T CD8+. En algunos casos, la composición de linfocitos T enriquecidos consiste esencialmente en linfocitos  
20 T CD4+.

En determinados casos, la una o más composiciones es o incluye una composición de linfocitos T CD8+ que es o incluye al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 %, al menos un  
25 99,9 %, o un o aproximadamente un 100 % de linfocitos T CD8+. En determinados casos, la composición de linfocitos T CD8+ contiene menos del 40 %, menos del 35 %, menos del 30 %, menos del 25 %, menos del 20 %, menos del 15 %, menos del 10 %, menos del 5 %, menos del 1 %, menos del 0,1 %, o menos del 0,01 % de linfocitos T CD4+, y/o no contiene linfocitos T CD4+, y/o está exenta o sustancialmente exenta de linfocitos T CD4+. En algunos casos, la composición de linfocitos T enriquecidos consiste esencialmente en linfocitos T CD8+.

30 En algunos casos, la una o más composiciones de linfocitos T enriquecidos de entrada se congelan, p. ej., crioconservan y/o criocongelan, después del aislamiento, selección y/o enriquecimiento. En algunos casos, la una o más composiciones de entrada se congelan, p. ej., crioconservan y/o criocongelan, antes de cualquier etapa de incubación, activar, estimular, modificación genética, transducir, transfectar, cultivar, expandirse, cosecha y/o formulación  
35 de la composición de las células. En casos particulares, la una o más composiciones de entrada criocongeladas se conservan, p. ej., a o aproximadamente a -80 °C, entre 12 horas y 7 días, entre 24 horas y 120 horas, o entre 2 días y 5 días. En casos particulares, la una o más composiciones de entrada criocongeladas se conservan a o aproximadamente a -80 °C, durante un periodo inferior a 10 días, 9 días, 8 días, 7 días, 6 días o 5 días, 4 días, 3 días, 2 días o 1 día. En algunos casos, la una o más composiciones de entrada criocongeladas se conservan a o  
40 aproximadamente a -80 °C, durante o durante aproximadamente 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días o 6 días.

## B. Activación y estimulación de las células

45 En algunos casos, los métodos divulgados se utilizan con relación a la incubación de células en condiciones de estimulación. En algunos casos, las condiciones de estimulación incluyen condiciones que activan o estimulan, y/o son capaces de activar o estimular una señal en la célula, p. ej., un linfocito T CD4+ o linfocito T CD8+, tal como una señal generada a partir de un TCR y/o un correceptor. En algunos casos, las condiciones de estimulación incluyen una o más etapas de cultivo, cultivar, incubación, activar, propagar las células con y/o en presencia de un reactivo estimulador, p. ej., un reactivo que activa o estimula, y/o es capaz de activar o estimular una señal en la célula. En  
50 algunos casos, el reactivo estimulador estimula y/o activa un TCR y/o un correceptor. En casos particulares, el reactivo estimulador es un reactivo descrito en la Sección I-B-1.

En determinados casos, una o más composiciones de linfocitos T enriquecidos se incuban en condiciones de estimulación antes de modificar genéticamente las células, p. ej., transfectar y/o transducir la célula, tal como mediante  
55 una técnica descrita en la Sección I-C. En casos particulares, una o más composiciones de linfocitos T enriquecidos se incuban en condiciones de estimulación después de que la una o más composiciones se han aislado, seleccionado, enriquecido u obtenido a partir de una muestra biológica. En casos particulares, la una o más composiciones son composiciones de entrada. En casos particulares, la una o más composiciones de entrada han sido previamente criocongeladas y almacenadas, y se descongelan antes de la incubación.

60 En determinados casos, la una o más composiciones de linfocitos T enriquecidos son o incluyen dos composiciones separadas, p. ej., composiciones de linfocitos T enriquecidos de entrada separadas. En casos particulares, dos composiciones de linfocitos T enriquecidos separadas, p. ej., dos composiciones de linfocitos T enriquecidos separadas seleccionadas, aisladas y/o enriquecidas a partir de la misma muestra biológica, se incuban por separado  
65 en condiciones de estimulación. En determinados casos, las dos composiciones separadas incluyen una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos. En casos particulares, las dos composiciones separadas incluyen una composición

de linfocitos T CD8+ enriquecidos. En algunos casos, dos composiciones de linfocitos T CD4+ enriquecidos y linfocitos T CD8+ enriquecidos separadas se incuban por separado en condiciones de estimulación.

5 En algunos casos, se incuba una única composición de linfocitos T enriquecidos en condiciones de estimulación. En determinados casos, la composición única es una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos. En algunos casos, la composición única es una composición de linfocitos T CD4+ y CD8+ enriquecidos que se han combinado a partir de composiciones separadas antes de la incubación.

10 En algunos casos, la composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos que se incuba en condiciones de estimulación incluye al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 %, al menos un 99,9 %, o un o aproximadamente un 100 % de linfocitos T CD4+. En determinados casos, la composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos que se incuba en condiciones de estimulación incluye menos del 40 %, menos del 35 %, menos del 30 %, menos del 25 %, menos del 20 %, menos del 15 %, menos del 10 %, menos del 5 %, menos del 1 %, menos del 0,1 %, o menos del 0,01 % de linfocitos T CD8+, y/o no contiene linfocitos T CD8+, y/o está exenta o sustancialmente exenta de linfocitos T CD8+.

20 En algunos casos, la composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos que se incuba en condiciones de estimulación incluye al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 %, al menos un 99,9 %, o un o aproximadamente un 100 % de linfocitos T CD8+. En determinados casos, la composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos que se incuba en condiciones de estimulación incluye menos del 40 %, menos del 35 %, menos del 30 %, menos del 25 %, menos del 20 %, menos del 15 %, menos del 10 %, menos del 5 %, menos del 1 %, menos del 0,1 %, o menos del 0,01 % de linfocitos T CD4+, y/o no contiene linfocitos T CD4+, y/o está exenta o sustancialmente exenta de linfocitos T CD4+.

30 En algunos casos, las composiciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ enriquecidos separadas se combinan en una única composición y se incuban en condiciones de estimulación. En determinados casos, las composiciones estimuladas de linfocitos T CD4+ enriquecidos y CD8+ enriquecidos separadas se combinan en una única composición una vez realizada y/o finalizada la incubación. En algunos casos, las composiciones estimuladas de linfocitos T CD4+ estimulados y CD8+ estimulados separadas se procesan por separado una vez realizada y/o finalizada la incubación, de modo que la población de linfocitos T CD4+ estimulados (p. ej., incubados con un reactivo estimulador de perlas magnéticas anti-CD3/anti-CD28) se transduce con un vector vírico que codifica una proteína recombinante (p. ej., CAR) y se cultiva en condiciones para expandir los linfocitos T y la población de linfocitos T CD8+ estimulados (p. ej., incubados con un reactivo estimulador de perlas magnéticas anti-CD3/anti-CD28) se transduce con un vector vírico que codifica una proteína recombinante (p. ej., CAR), tal como la misma proteína recombinante que para la modificación genética de los linfocitos T CD4+ del mismo donante, y cultivados en condiciones para expandir los linfocitos T, de acuerdo con los métodos divulgados.

40 En algunos casos, la incubación en condiciones de estimulación puede incluir el cultivo, estimulación, activación, propagación, incluso mediante incubación en presencia de condiciones estimuladoras, por ejemplo, condiciones diseñadas para inducir la proliferación, expansión, activación y/o supervivencia de células en la población, para imitar la exposición al antígeno y/o para cebar las células para la modificación genética, tal como para la introducción de un receptor de antígeno recombinante. En casos particulares, las condiciones de estimulación pueden incluir uno o más de medios particulares, temperatura, contenido de oxígeno, contenido de dióxido de carbono, tiempo, agentes, p. ej., nutrientes, aminoácidos, antibióticos, iones y/o factores estimulantes, tales como citocinas, quimiocinas, antígenos, compañeros de unión, proteínas de fusión, receptores solubles recombinantes y cualquier otro agente diseñado para activar las células.

50 En algunos casos, la estimulación y/o incubación en condiciones de estimulación se lleva a cabo de acuerdo con técnicas como las descritas en la Patente US-6.040.177 de Riddell *et al.*, Klebanoff *et al.* (2012) J Immunother. 35(9): 651-660, Terakura *et al.* (2012) Blood. 1:72-82 y/o Wang *et al.* (2012) J Immunother. 35(9):689-701.

55 En algunos casos, las células, p. ej., linfocitos T, composiciones de células y/o poblaciones celulares, tales como linfocitos T CD4+ y CD8+ o composiciones, poblaciones o subpoblaciones de las mismas, se expanden añadiendo a la composición de inicio de cultivo células alimentadoras, tales como células mononucleares de sangre periférica (CMSP) que no se dividen (p. ej., de forma que la población resultante de células contenga al menos aproximadamente 5, 10, 20 o 40 o más células alimentadoras CMSP por cada linfocito T de la población inicial que se va a expandir); e incuban el cultivo (p. ej., durante un tiempo suficiente para expandir el número de linfocitos T). En algunos casos, las células alimentadoras que no se dividen pueden comprender células alimentadoras de CMSP irradiadas con rayos gamma. En algunos casos, las CMSP se irradian con rayos gamma en el intervalo de aproximadamente 3000 a 3600 rads para evitar la división celular. En algunos casos, las células alimentadoras se añaden al medio de cultivo antes de la adición de las poblaciones de linfocitos T.

65 En algunos casos, las condiciones de estimulación incluyen una temperatura adecuada para el crecimiento de linfocitos T humanos, por ejemplo, al menos aproximadamente 25 grados Celsius, generalmente al menos



aproximadamente 30 grados, y generalmente o aproximadamente 37 grados Celsius. En algunos casos, durante el cultivo se produce un cambio de temperatura, tal como de 37 grados Celsius a 35 grados Celsius. Opcionalmente, la incubación puede comprender además la adición de células linfoblastoides (LCL) transformadas con EBV que no se dividen como células alimentadoras. Las LCL se pueden irradiar con rayos gamma en el intervalo de aproximadamente 6000 a 10.000 rads. Las células alimentadoras LCL en algunos casos se proporcionan en cualquier cantidad adecuada, tal como una proporción entre células alimentadoras LCL y linfocitos T iniciales de al menos aproximadamente 10:1.

En unos casos, las poblaciones de CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> que son específicas de antígeno pueden obtenerse mediante estimulación de linfocitos T indiferenciados o específicos de antígeno con antígeno. Por ejemplo, se pueden generar líneas o clones de linfocitos T específicos de antígeno para antígenos de citomegalovirus aislando linfocitos T de sujetos infectados y estimulando las células *in vitro* con el mismo antígeno. También pueden usarse linfocitos T indiferenciados.

En casos particulares, las condiciones de estimulación incluyen la incubación y/o cultivo de las células con un reactivo estimulador. En casos particulares, el reactivo estimulador es un reactivo descrito en la Sección I-B-1. En determinados casos, el reactivo estimulador contiene o incluye una perla. Un reactivo estimulador ilustrativo es o incluye perlas magnéticas anti-CD3/anti-CD28. En determinados casos, el comienzo y/o inicio de la incubación, y/o el cultivo de células en condiciones de estimulación se produce cuando las células entran en contacto con y/o se incuban con el reactivo estimulador. En casos particulares, las células se incuban antes, durante y/o después de la modificación genética de las células, p. ej., introduciendo un polinucleótido recombinante en la célula, tal como mediante transducción o transfección.

En algunos casos, la composición de linfocitos T enriquecidos se incubaba en una proporción entre reactivo estimulador y/o perlas, p. ej., perlas magnéticas anti-CD3/anti-CD28, y células de o aproximadamente 3:1, 2,5:1, 2:1, 1,5:1, 1,25:1, 1,2:1, 1,1:1, 1:1, 0,9:1, 0,8:1, 0,75:1, 0,67:1, 0,5:1, 0,3:1, o 0,2:1. En casos particulares, la proporción entre reactivo estimulador y/o perlas y las células está comprendida entre 2,5:1 y 0,2:1, entre 2:1 y 0,5:1, entre 1,5:1 y 0,75:1, entre 1,25:1 y 0,8:1, entre 1,1:1 y 0,9:1. En casos particulares, la proporción entre el reactivo estimulador y las células es de aproximadamente 1:1 o es 1:1.

En casos particulares, la incubación de las células en una proporción inferior a 3:1 o inferior a 3 reactivos estimuladores, p. ej., perlas magnéticas anti-CD3/anti-CD28 por célula, tal como una proporción de 1:1, reduce la cantidad de muerte celular que se produce durante la incubación, p. ej., tal como por muerte celular inducida por activación. En algunos casos, las células se incuban con el reactivo estimulador, p. ej., perlas magnéticas anti-CD3/anti-CD28, en una proporción entre perlas y células inferior a 3 (o 3:1 o inferior a 3 perlas por célula). En casos particulares, la incubación de las células en una proporción inferior a 3:1 o inferior a 3 perlas por célula, tal como una proporción de 1:1, reduce la cantidad de muerte celular que se produce durante la incubación, p. ej., tal como por muerte celular inducida por activación.

En casos particulares, la composición de linfocitos T enriquecidos se incubaba con el reactivo estimulador, p. ej., perlas magnéticas anti-CD3/anti-CD28, en una proporción inferior a 3:1 de reactivos y/o perlas estimuladores por célula, tal como una proporción de 1:1, y al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 %, o al menos un 99,9 % de los linfocitos T sobreviven, p. ej., son viables y/o no sufren necrosis, muerte celular programada, o apoptosis, durante o al menos 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, o más de 7 días después de finalizada la incubación. En casos particulares, la composición de linfocitos T enriquecidos se incubaba con el reactivo estimulador en una proporción inferior a 3:1 de reactivos y/o perlas estimuladores por célula, p. ej., una proporción de 1:1, y menos del 50 %, menos del 40 %, menos del 30 %, menos del 25 %, menos del 20 %, menos del 15 %, menos del 10 %, menos del 5 %, menos del 1 %, menos del 0,1 % o menos del 0,01 % de las células sufren muerte celular inducida por activación durante la incubación.

En determinados casos, la composición de linfocitos T enriquecidos se incubaba con el reactivo estimulador, p. ej., perlas magnéticas anti-CD3/anti-CD28, en una proporción inferior a 3:1 de perlas por célula, p. ej., en una proporción de 1:1, y las células de la composición tienen al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 100 %, al menos un 150 %, al menos 1 vez, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, o al menos 100 veces mayor supervivencia en comparación con las células sometidas a un proceso ilustrativo y/o alternativo donde la composición de linfocitos T enriquecidos se incubaba con el reactivo estimulador en una proporción de 3:1 o superior.

En algunos casos, la composición de linfocitos T enriquecidos incubada con el reactivo estimulador comprende de  $1,0 \times 10^5$  células/ml a  $1,0 \times 10^8$  células/ml o de aproximadamente  $1,0 \times 10^5$  células/ml a aproximadamente  $1,0 \times 10^8$  células/ml, tal como al menos o aproximadamente al menos  $1,0 \times 10^5$  células/ml,  $5 \times 10^5$  células/ml,  $1 \times 10^6$  células/ml,  $5 \times 10^6$  células/ml,  $1 \times 10^7$  células/ml,  $5 \times 10^7$  células/ml o  $1 \times 10^8$  células/ml. En algunos casos, la composición de linfocitos T enriquecidos incubada con el reactivo estimulador comprende aproximadamente  $0,5 \times 10^6$  células/ml,  $1 \times 10^6$  células/ml,  $1,5 \times 10^6$  células/ml,  $2 \times 10^6$  células/ml,  $2,5 \times 10^6$  células/ml,  $3 \times 10^6$  células/ml,  $3,5 \times 10^6$  células/ml,  $4$

$10^6$  células/ml,  $4,5 \times 10^6$  células/ml,  $5 \times 10^6$  células/ml,  $5,5 \times 10^6$  células/ml,  $6 \times 10^6$  células/ml,  $6,5 \times 10^6$  células/ml,  $7 \times 10^6$  células/ml,  $7,5 \times 10^6$  células/ml,  $8 \times 10^6$  células/ml,  $8,5 \times 10^6$  células/ml,  $9 \times 10^6$  células/ml,  $9,5 \times 10^6$  células/ml o  $10 \times 10^6$  células/ml, tal como aproximadamente  $2,4 \times 10^6$  células/ml.

- 5 En algunos casos, la composición de linfocitos T enriquecidos se incuba con el reactivo estimulador a una temperatura comprendida de aproximadamente 25 a aproximadamente 38 °C, tal como de aproximadamente 30 a aproximadamente 37 °C, por ejemplo, a o aproximadamente 37 °C  $\pm$  2 °C. En algunos casos, la composición de linfocitos T enriquecidos se incuba con el reactivo estimulador a un nivel de CO<sub>2</sub> de aproximadamente 2,5 % a aproximadamente 7,5 %, tal como de aproximadamente 4 % a aproximadamente 6 %, por ejemplo a o
- 10 aproximadamente 5 %  $\pm$  0,5 %. En algunos casos, la composición de linfocitos T enriquecidos se incuba con el reactivo estimulador a una temperatura de o aproximadamente 37 °C y/o a un nivel de CO<sub>2</sub> de o aproximadamente el 5 %.

En casos particulares, las condiciones de estimulación incluyen la incubación y/o cultivo de una composición de linfocitos T enriquecidos con y/o en presencia de una o más citocinas. En casos particulares, la una o más citocinas son citocinas recombinantes. En algunos casos, la una o más citocinas son citocinas recombinantes humanas. En determinados casos, las una o más citocinas se unen y/o son capaces de unirse a receptores que son expresados por y/o son endógenos de los linfocitos T. En casos particulares, la una o más citocinas son o incluyen un miembro de la familia de citocinas del haz de 4 hélices alfa. En algunos casos, los miembros de la familia de citocinas del haz de 4 hélices alfa incluyen, pero no se limitan a, interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-7 (IL-7), interleucina-9 (IL-9), interleucina-12 (IL-12), interleucina-15 (IL-15), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) y factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). En algunos casos, la una o más citocinas es o incluye IL-15. En casos particulares, la una o más citocinas es o incluye IL-7. En casos particulares, la una o más citocinas es o incluye IL-2. En algunos casos, las condiciones de estimulación incluyen la incubación de la composición de linfocitos T enriquecidos, tal como linfocitos T CD4+ enriquecidos o linfocitos T CD8+ enriquecidos, en presencia de un reactivo estimulador, p. ej., perlas magnéticas anti-CD3/anti-CD28, como se ha descrito y en presencia de una o más citocinas recombinantes.

En casos particulares, la composición de los linfocitos T CD4+ enriquecidos se incuban con IL-2, p. ej., IL-2 recombinante. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, casos particulares contemplan que los linfocitos T CD4+ que se obtienen de algunos sujetos no producen, o no producen suficientemente, IL-2 en cantidades que permitan el crecimiento, división y expansión a lo largo del proceso para generar una composición de células de salida, p. ej., células modificadas genéticamente adecuadas para su uso en terapia celular. En algunos casos, incubar una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos en condiciones de estimulación en presencia de IL-2 recombinante aumenta la probabilidad de que los linfocitos T CD4+ de la composición sigan sobreviviendo, multiplicándose, expandiéndose o activándose durante la fase de incubación y a lo largo de todo el proceso. En algunos casos, incubar la composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos en presencia de IL-2 recombinante aumenta la probabilidad y/o posibilidad de que se produzca una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos de salida, p. ej., linfocitos T CD4+ modificados genéticamente adecuados para la terapia celular, a partir de la composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos en al menos un 0,5%, al menos un 1 %, al menos un 2 %, al menos un 3 %, al menos un 4 %, al menos un 5 %, al menos un 6 %, al menos un 7 %, al menos un 8 %, al menos un 9 %, al menos un 10 %, al menos un 11 %, al menos un 12 %, al menos un 13 %, al menos un 14 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 100 %, al menos un 150 %, al menos 1 vez, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, o al menos 100 veces en comparación con un método alternativo y/o ilustrativo que no incubaba la composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos en presencia de IL-2 recombinante.

En determinados casos, la cantidad o concentración de la una o más citocinas se miden y/o cuantifican con Unidades Internacionales (UI). Pueden utilizarse unidades internacionales para cuantificar las vitaminas, hormonas, citocinas, vacunas, hemoderivados y sustancias biológicamente activas similares. En algunos casos, las UI son o incluyen unidades de medida de la potencia de preparados biológicos por comparación con un patrón de referencia internacional de un peso y potencia específicos, p. ej., Primera norma internacional de la OMS para la IL-2 humana, 86/504. Las Unidades Internacionales son el único método reconocido y estandarizado para expresar las unidades de actividad biológica que se publican y se derivan de un esfuerzo de investigación colaborativa internacional. En casos particulares, la UI para la composición, muestra o fuente de una citocina puede obtenerse mediante pruebas de comparación de productos con un producto estándar análogo de la OMS. Por ejemplo, en algunos casos, las UI/mg de una composición, muestra o fuente de IL-2, IL-7, o IL-15 recombinante humana, se compara con el producto IL-2 patrón de la OMS (código NIBSC: 86/500), el producto IL-17 patrón de la OMS (código NIBSC: 90/530) y el producto IL-15 patrón de la OMS (código NIBSC: 95-554), respectivamente.

En algunos casos, la actividad biológica en UI/mg equivale a (DE<sub>50</sub> en ng/ml)<sup>-1</sup>  $\times 10^6$ . En casos particulares, la DE<sub>50</sub> de IL-2 o IL-15 humana recombinante es equivalente a la concentración necesaria para la estimulación semimáxima de la proliferación celular (escisión XTT) con células CTLL-2. En determinados casos, la DE<sub>50</sub> de IL-7 humana recombinante es equivalente a la concentración necesaria para la estimulación semimáxima de la proliferación de linfocitos de sangre periférica humana activados por PHA. Los detalles relativos a los ensayos y cálculos de UI para IL-2 se analizan en Wadhwa *et al.*, Journal of Immunological Methods (2013), 379 (1-2): 1-7; y Gearing y Thorpe,

Journal of Immunological Methods (1988), 114 (1-2): 3-9; los detalles relativos a los ensayos y cálculos de UI para IL-15 se analizan en Soman *et al.* Journal of Immunological Methods (2009) 348 (1-2): 83-94.

En casos particulares, una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos se incubaba en condiciones de estimulación en presencia de IL-2 y/o IL-15. En determinados casos, una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos se incubaba en condiciones de estimulación en presencia de IL-2, IL-7 y/o IL-15. En algunos casos, la IL-2, la IL-7 y/o la IL-15 son recombinantes. En determinados casos, la IL-2, la IL-7 y/o la IL-15 son humanas. En casos particulares, la una o más citocinas son o incluyen IL-2, IL-7 y/o IL-15 recombinante humana. En algunos casos, la incubación de la composición de linfocitos T enriquecidos también incluye la presencia de un reactivo estimulador, p. ej., perlas magnéticas anti-CD3/anti-CD28.

En algunos casos, las células se incuban con una citocina, p. ej., una citocina humana recombinante, a una concentración de entre 1 UI/ml y 1.000 UI/ml, entre 10 UI/ml y 50 UI/ml, entre 50 UI/ml y 100 UI/ml, entre 100 UI/ml y 200 UI/ml, entre 100 UI/ml y 500 UI/ml, entre 250 UI/ml y 500 UI/ml, o entre 500 UI/ml y 1.000 UI/ml.

En algunos casos, una composición de linfocitos T enriquecidos se incubaba con IL-2, p. ej., IL-2 humana recombinante, a una concentración comprendida entre 1 UI/ml y 200 UI/ml, entre 10 UI/ml y 200 UI/ml, entre 10 UI/ml y 100 UI/ml, entre 50 UI/ml y 150 UI/ml, entre 80 UI/ml y 120 UI/ml, entre 60 UI/ml y 90 UI/ml, o entre 70 UI/ml y 90 UI/ml. En casos particulares, la composición de linfocitos T enriquecidos se incubaba con IL-2 recombinante a una concentración de o aproximadamente 50 UI/ml, 55 UI/ml, 60 UI/ml, 65 UI/ml, 70 UI/ml, 75 UI/ml, 80 UI/ml, 85 UI/ml, 90 UI/ml, 95 UI/ml, 100 UI/ml, 110 UI/ml, 120 UI/ml, 130 UI/ml, 140 UI/ml o 150 UI/ml. En algunos casos, la composición de linfocitos T enriquecidos se incubaba en presencia de o de aproximadamente 85 UI/ml de IL-2 recombinante. En algunos casos, la composición incubada con IL-2 recombinante está enriquecida en una población de linfocitos T, p. ej., linfocitos T CD4+ y/o linfocitos T CD8+. En algunos casos, la población de linfocitos T es una población de linfocitos T CD4+. En algunos casos, la composición de linfocitos T enriquecidos es una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos. En casos particulares, la composición de linfocitos T enriquecidos está enriquecida en linfocitos T CD8+, donde no se enriquece en linfocitos T CD4+ y/o donde los linfocitos T CD4+ se seleccionan negativamente o se agotan en la composición. En algunos casos, la composición de linfocitos T enriquecidos es una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos. En casos particulares, la composición de linfocitos T enriquecidos está enriquecida en linfocitos T CD4+, donde no se enriquece en linfocitos T CD8+ y/o donde los linfocitos T CD8+ se seleccionan negativamente o se agotan en la composición. En algunos casos, una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos incubada con IL-2 recombinante también puede incubarse con IL-7 recombinante y/o IL-15 recombinante, tal como en las cantidades descritas. En algunos casos, una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos incubada con IL-2 recombinante también puede incubarse con IL-15 recombinante, tal como en las cantidades descritas.

En algunos casos, una composición de linfocitos T enriquecidos se incubaba con IL-7 recombinante, p. ej., IL-7 humana recombinante, a una concentración comprendida entre 100 UI/ml y 2.000 UI/ml, entre 500 UI/ml y 1.000 UI/ml, entre 100 UI/ml y 500 UI/ml, entre 500 UI/ml y 750 UI/ml, entre 750 UI/ml y 1.000 UI/ml, o entre 550 UI/ml y 650 UI/ml. En casos particulares, la composición de linfocitos T enriquecidos se incubaba con IL-7 recombinante a una concentración de o aproximadamente 50 UI/ml, 100 UI/ml, 150 UI/ml, 200 UI/ml, 250 UI/ml, 300 UI/ml, 350 UI/ml, 400 UI/ml, 450 UI/ml, 500 UI/ml, 550 UI/ml, 600 UI/ml, 650 UI/ml, 700 UI/ml, 750 UI/ml, 800 UI/ml, 750 UI/ml, 750 UI/ml, 750 UI/ml o 1.000 UI/ml. En casos particulares, la composición de linfocitos T enriquecidos se incubaba en presencia de o de aproximadamente 600 UI/ml de IL-7 recombinante. En algunos casos, la composición incubada con IL-7 recombinante está enriquecida en una población de linfocitos T, p. ej., linfocitos T CD4+. En algunos casos, una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos incubada con IL-7 recombinante también puede incubarse con IL-2 recombinante y/o IL-15 recombinante, tal como en las cantidades descritas. En casos particulares, la composición de linfocitos T enriquecidos está enriquecida en linfocitos T CD4+, donde no se enriquece en linfocitos T CD8+ y/o donde los linfocitos T CD8+ se seleccionan negativamente o se agotan en la composición. En algunos casos, una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos no se incubaba con IL-7 recombinante.

En algunos casos, una composición de linfocitos T enriquecidos se incubaba con IL-15 recombinante, p. ej., IL-15 humana recombinante, a una concentración comprendida entre 0,1 UI/ml y 100 UI/ml, entre 1 UI/ml y 100 UI/ml, entre 1 UI/ml y 50 UI/ml, entre 5 UI/ml y 25 UI/ml, entre 25 UI/ml y 50 UI/ml, entre 5 UI/ml y 15 UI/ml, o entre 10 UI/ml y 100 UI/ml. En casos particulares, la composición de linfocitos T enriquecidos se incubaba con IL-15 recombinante a una concentración de o aproximadamente 1 UI/ml, 2 UI/ml, 3 UI/ml, 4 UI/ml, 5 UI/ml, 6 UI/ml, 7 UI/ml, 8 UI/ml, 9 UI/ml, 10 UI/ml, 11 UI/ml, 12 UI/ml, 13 UI/ml, 14 UI/ml, 15 UI/ml, 20 UI/ml, 25 UI/ml, 30 UI/ml, 40 UI/ml o 50 UI/ml. En algunos casos, la composición de linfocitos T enriquecidos se incubaba en o en aproximadamente 10 UI/ml de IL-15 recombinante. En algunos casos, la composición incubada con IL-15 recombinante está enriquecida en una población de linfocitos T, p. ej., linfocitos T CD4+ y/o linfocitos T CD8+. En algunos casos, la población de linfocitos T es una población de linfocitos T CD4+. En algunos casos, la composición de linfocitos T enriquecidos es una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos. En casos particulares, la composición de linfocitos T enriquecidos está enriquecida en linfocitos T CD8+, donde no se enriquece en linfocitos T CD4+ y/o donde los linfocitos T CD4+ se seleccionan negativamente o se agotan en la composición. En algunos casos, la composición de linfocitos T enriquecidos es una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos. En casos particulares, la composición de linfocitos T enriquecidos está enriquecida en linfocitos T CD4+, donde no se enriquece en linfocitos T CD8+ y/o donde los linfocitos T CD8+ se seleccionan negativamente o se agotan en la composición. En algunos casos, una composición de linfocitos T CD4+

enriquecidos incubada con IL-15 recombinante también puede incubarse con IL-7 recombinante y/o IL-2 recombinante, tal como en las cantidades descritas. En algunos casos, una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos incubada con IL-15 recombinante también puede incubarse con IL-2 recombinante, tal como en las cantidades descritas.

- 5 En casos particulares, las células, tales como linfocitos T CD4+ enriquecidos y/o linfocitos T CD8+ enriquecidos, se incuban con el reactivo estimulador en presencia de uno o más antioxidantes. En algunos casos, los antioxidantes incluyen, pero no se limitan a, uno o más antioxidantes que comprenden un tocoferol, un tocotrienol, alfa-tocoferol, beta-tocoferol, gamma-tocoferol, delta-tocoferol, alfa-tocotrienol, beta-tocotrienol, alfa-tocoferolquinona, Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT),  
 10 flavonoides, una isoflavona, licopeno, beta-caroteno, selenio, ubiquinona, luteína, S-adenosilmetionina, glutatión, taurina, N-acetilcisteína (NAC), ácido cítrico, L-carnitina, HTB, monotioglicerol, ácido ascórbico, galato de propilo, metionina, cisteína, homocisteína, glutatión, cistamina y cistationina, y/o glicina-glicina-histidina. En algunos casos, la incubación de la composición de linfocitos T enriquecidos, tales como linfocitos T CD4+ enriquecidos y/o linfocitos T CD8+ enriquecidos, con un antioxidante también incluye la presencia de un reactivo estimulador, p. ej., perlas magnéticas anti-CD3/anti-CD28, y una o más citocinas recombinantes, tal como se describe.

- En algunos casos, el uno o más antioxidantes es o incluye un oxidante que contiene azufre. En determinados casos, un antioxidante que contenga azufre puede incluir antioxidantes que contengan tiol y/o antioxidantes que presenten una o más fracciones de azufre, p. ej., dentro de una estructura anular. En algunos casos, los antioxidantes que  
 20 contienen azufre pueden incluir, por ejemplo, N-acetilcisteína (NAC) y 2,3- dimercaptopropanol (DMP), L-2-oxo-4-tiazolidinocarboxilato (OTC) y ácido lipoico. En casos particulares, el antioxidante que contiene azufre es un precursor del glutatión. En algunos casos, el precursor del glutatión es una molécula que puede modificarse en una o más etapas dentro de una célula para obtener glutatión. En casos particulares, un precursor del glutatión puede incluir, pero sin limitarse a N-acetil cisteína (NAC), ácido L-2-oxotiazolidin-4-carboxílico (procisteína), ácido lipoico, S-alil cisteína, o  
 25 cloruro de metilmetionina sulfonio.

- En algunos casos, incubar las células, tales como linfocitos T CD4+ enriquecidos y/o linfocitos T CD8+ enriquecidos, en condiciones de estimulación incluye la incubación de las células en presencia de uno o más antioxidantes. En casos particulares, las células se estimulan con el reactivo estimulador en presencia de uno o más antioxidantes. En algunos  
 30 casos, las células se incuban en presencia de entre 1 ng/ml y 100 ng/ml, entre 10 ng/ml y 1 µg/ml, entre 100 ng/ml y 10 µg/ml, entre 1 µg/ml y 100 µg/ml, entre 10 µg/ml y 1 mg/ml, entre 100 µg/ml y 1 mg/ml, entre 1 500 µg/ml y 2 mg/ml, 500 µg/ml y 5 mg/ml, entre 1 mg/ml y 10 mg/ml, o entre 1 mg/ml y 100 mg/ml de uno o más antioxidantes. En algunos casos, las células se incuban en presencia de o aproximadamente de 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml, 0,2 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,8 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20  
 35 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml, 200 mg/ml, 300 mg/ml, 400 mg/ml, 500 mg/ml del uno o más antioxidantes. En algunos casos, el uno o más antioxidantes es o incluye un antioxidante que contiene azufre. En casos particulares, el uno o más antioxidantes es o incluye un precursor del glutatión.

- En algunos casos, el uno o más antioxidantes es o incluye N-acetil cisteína (NAC). En algunos casos, incubar las células, tales como linfocitos T CD4+ enriquecidos y/o linfocitos T CD8+ enriquecidos, en condiciones de estimulación incluye la incubación de las células en presencia de NAC. En casos particulares, las células se estimulan con el reactivo estimulador en presencia de NAC. En algunos casos, las células se incuban en presencia de entre 1 ng/ml y 100 ng/ml, entre 10 ng/ml y 1 µg/ml, entre 100 ng/ml y 10 µg/ml, entre 1 µg/ml y 100 µg/ml, entre 10 µg/ml y 1 mg/ml, entre 100 µg/ml y 1 mg/ml, entre 1-500 µg/ml y 2 mg/ml, 500 µg/ml y 5 mg/ml, entre 1 mg/ml y 10 mg/ml, o entre 1  
 45 mg/ml y 100 mg/ml de NAC. En algunos casos, las células se incuban en presencia de o aproximadamente de 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml, 0,2 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,8 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml, 200 mg/ml, 300 mg/ml, 400 mg/ml, 500 mg/ml de NAC. En algunos casos, las células se incuban con o con aproximadamente 0,8 mg/ml.

- En casos particulares, incubar la composición de linfocitos T enriquecidos, tales como linfocitos T CD4+ enriquecidos y/o linfocitos T CD8+ enriquecidos, en presencia de uno o más antioxidantes, p. ej., NAC, reduce la activación en las células en comparación con las células incubadas en procesos alternativos y/o ilustrativos sin la presencia de antioxidantes. En determinados casos, la activación reducida se mide por la expresión de uno o más marcadores de activación en la célula. En determinados casos, los marcadores de activación incluyen, pero no se limitan a, aumento de la complejidad intracelular (p. ej., determinada por la medición de la dispersión lateral (SSC), aumento del tamaño celular (p. ej., determinado mediante la medición del diámetro celular y/o la dispersión frontal (FSC), aumento de la expresión de CD27 y/o reducción de la expresión de CD25. En algunos casos, las células de la composición tienen una expresión y/o grado de marcadores de activación negativo, reducido o bajo cuando se examinan durante o después de la incubación, modificación genética, transducción, transfección, expansión o formulación, o durante o  
 50 después de cualquier etapa del proceso que tenga lugar tras la incubación. En algunos casos, las células de la composición tienen una expresión y/o grado de marcadores de activación negativo, reducido o bajo una vez finalizado el proceso. En casos particulares, las células de la composición de salida tienen una expresión y/o grado de marcadores de activación negativo, reducido o bajo.

- En algunos casos, la citometría de flujo se utiliza para determinar el tamaño relativo de las células. En casos particulares, los parámetros FSC y SSC se utilizan para analizar las células y distinguir las células entre sí en función

de su tamaño y complejidad interna. En casos particulares, una partícula o perla de tamaño conocido puede medirse como patrón para determinar el tamaño real de las células. En algunos casos, la citometría de flujo se utiliza en combinación con una tinción, p. ej., un anticuerpo marcado, para medir o cuantificar la expresión de una proteína de superficie, tal como un marcador de activación, p. ej., CD25 o CD27.

5 En algunos casos, la composición de linfocitos T enriquecidos, tales como linfocitos T CD4+ enriquecidos y/o linfocitos T CD8+ enriquecidos, se incuba en presencia de uno o más antioxidantes, p. ej., NAC, y el diámetro celular se redujo al menos 0,25 µm, 0,5 µm, 0,75 µm, 1,0 µm, 1,5 µm, 2 µm, 2,5 µm, 3 µm, 3,5 µm, 4 µm, 4,5 µm, 5 µm, o más de 5 µm en comparación con las células incubadas en un proceso alternativo y/o ilustrativo donde la incubación no se realiza en presencia de un antioxidante. En casos particulares, la composición de linfocitos T enriquecidos se incuba en presencia de uno o más antioxidantes, p. ej., NAC, y el tamaño celular, medido por el FSC se reduce al menos un 1 %, al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, o al menos un 90 % en comparación con las células incubadas en un proceso alternativo y/o ilustrativo donde la incubación no se realiza en presencia de un antioxidante.

15 En algunos casos, la composición de linfocitos T enriquecidos, tales como linfocitos T CD4+ enriquecidos y/o linfocitos T CD8+ enriquecidos, se incuba en presencia de uno o más antioxidantes, p. ej., NAC, y la complejidad intracelular, medida por el SSC, se reduce al menos un 1 %, al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, o al menos un 90 % en comparación con las células incubadas en un proceso alternativo y/o ilustrativo donde la incubación no se realiza en presencia de un antioxidante.

20 En casos particulares, la composición de linfocitos T enriquecidos, tales como linfocitos T CD4+ enriquecidos y/o linfocitos T CD8+ enriquecidos, se incuba en presencia de uno o más antioxidantes, p. ej., NAC, y la expresión de CD27, p. ej., medida por citometría de flujo, se reduce al menos un 1 %, al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, o al menos un 99 % en comparación con las células incubadas en un proceso alternativo y/o ilustrativo donde la incubación no se realiza en presencia de un antioxidante.

25 En determinados casos, la composición de linfocitos T enriquecidos, tales como linfocitos T CD4+ enriquecidos y/o linfocitos T CD8+ enriquecidos, se incuba en presencia de uno o más antioxidantes, p. ej., NAC, y la expresión de CD25, p. ej., medida por citometría de flujo, aumenta al menos un 1 %, al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 100 %, al menos un 150 %, al menos 1 vez, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, o al menos 100 veces en comparación con las células incubadas en un proceso alternativo y/o ilustrativo donde la incubación no se realiza en presencia de un antioxidante.

30 En casos particulares, incubar la composición de linfocitos T enriquecidos, tales como linfocitos T CD4+ enriquecidos y/o linfocitos T CD8+ enriquecidos, en presencia de uno o más antioxidantes, p. ej., NAC, aumenta la expansión, p. ej., durante la etapa o fase de incubación o cultivo, tal como se describe en la Sección I-D. En algunos casos, una composición de células enriquecidas logra una expansión 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, nueve veces, 10 veces, o más de 10 veces superior en un plazo de 14 días, 12 días, 10 días, 9 días, 8 días, 7 días, 6 días, 5 días, 4 días, o en los 3 días siguientes al inicio del cultivo. En algunos casos, la composición de linfocitos T enriquecidos se incuba en presencia de uno o más antioxidantes y las células de las composiciones experimentan al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 100 %, al menos un 150 %, al menos 1 vez, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces de tasa de expansión más rápida durante el cultivo que las células cultivadas que se incubaron en un proceso alternativo y/o ilustrativo donde la incubación no se realiza en presencia de un antioxidante.

40 En casos particulares, incubar la composición de células enriquecidas, tales como linfocitos T CD4+ enriquecidos y/o linfocitos T CD8+ enriquecidos, en presencia de uno o más antioxidantes, p. ej., NAC, reduce la cantidad de muerte celular, p. ej., por apoptosis. En algunos casos, la composición de linfocitos T enriquecidos se incuba en presencia de uno o más antioxidantes, p. ej., NAC, y al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 %, o al menos un 99,9 % de las células sobreviven, p. ej., no sufren apoptosis, durante o al menos 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, o más de 7 días después de finalizada la incubación. En algunos casos, la composición se incuba en presencia de uno o más antioxidantes, p. ej., NAC, y las células de la composición tienen al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 100 %, al menos un 150 %, al menos 1 vez, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, o al menos 100 veces mayor supervivencia en comparación con las células sometidas a un proceso ilustrativo y/o

alternativo donde las células no se incuban en presencia de uno o más antioxidantes.

En casos particulares, la composición de linfocitos T enriquecidos, tales como linfocitos T CD4+ enriquecidos y/o linfocitos T CD8+ enriquecidos, se incuban en presencia de uno o más antioxidantes, p. ej., NAC, y la expresión de caspasas, p. ej., la expresión de la caspasa 3, se reduce al menos un 1 %, al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, o al menos un 99 % en comparación con las células incubadas en un proceso alternativo y/o ilustrativo donde la incubación no se realiza en presencia de un antioxidante.

En algunos casos, las composiciones o células, tales como linfocitos T CD4+ enriquecidos y/o linfocitos T CD8+ enriquecidos, se incuban en presencia de condiciones de estimulación o de un agente estimulador, tal como se describe. Tales condiciones incluyen las diseñadas para inducir la proliferación, expansión, activación y/o supervivencia de células en la población, para imitar la exposición al antígeno y/o para cebar las células para la modificación genética, tal como para la introducción de un receptor de antígeno recombinante. Ejemplos de reactivos estimulantes, tales como las perlas magnéticas anti-CD3/anti-CD28, se describen a continuación. La incubación con el reactivo estimulador también puede llevarse a cabo en presencia de una o más citocinas estimulantes, tales como en presencia de una o más de IL-2 recombinante, IL-7 recombinante y/o IL-15 recombinante y/o en presencia de al menos un antioxidante tal como NAC, tal como se ha descrito anteriormente. En algunos casos, una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos se incuban en condiciones de estimulación con un agente estimulador, IL-2 recombinante, IL-7 recombinante, IL-15 recombinante y NAC, tal como en las cantidades como se describe. En algunos casos, una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos se incuban en condiciones de estimulación con un agente estimulador, IL-2 recombinante, IL-15 recombinante y NAC, tal como en las cantidades como se describe.

En algunos casos, las condiciones de estimulación y/o activación pueden incluir uno o más medios particulares, temperatura, contenido de oxígeno, contenido de dióxido de carbono, tiempo, agentes, p. ej., nutrientes, aminoácidos, antibióticos, iones y/o factores estimulantes, tales como citocinas, quimiocinas, antígenos, compañeros de unión, proteínas de fusión, receptores solubles recombinantes y cualquier otro agente diseñado para activar las células.

En algunos casos, la incubación se lleva a cabo de acuerdo con técnicas tales como las descritas en la patente de EE.UU. N.º 6.040.1 77 de Riddell. *et al.*, Klebanoff *et al.* (2012) J Immunother. 35(9): 651-660, Terakura *et al.* (2012) Blood. 1:72-82, y/o Wang *et al.* (2012) J Immunother. 35(9):689-701.

En algunos casos, al menos una parte de la incubación en presencia de una o más condiciones de estimulación o de un agente estimulador se lleva a cabo en la cavidad interna de una cámara centrífuga, por ejemplo, con rotación centrífuga, tal como se describe en la publicación internacional número WO2016/073602. En algunos casos, al menos una parte de la incubación realizada en una cámara centrífuga incluye la mezcla con un reactivo o reactivos para inducir la estimulación y/o activación. En algunos casos, células, tales como las células seleccionadas, se mezclan con una condición de estimulación o un agente estimulador en la cámara centrífuga. En algunos casos de estos procesos, un volumen de células se mezcla con una cantidad de una o más condiciones o agentes de estimulación que es muy inferior a la que se emplea normalmente cuando se realizan estimulaciones similares en una placa de cultivo celular u otro sistema.

En algunos casos, el agente estimulador se añade a las células en la cavidad de la cámara en una cantidad que es sustancialmente inferior a (p. ej., no es superior al 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 % u 80 % de la cantidad) en comparación con la cantidad del agente estimulador que se utiliza habitualmente o que sería necesaria para lograr aproximadamente la misma o similar eficacia de selección del mismo número de células o del mismo volumen de células cuando la selección se realiza sin mezclar en una cámara centrífuga, p. ej., en un tubo o bolsa con agitación o rotación periódicas. En algunos casos, la incubación se realiza con la adición de un tampón de incubación a las células y el agente estimulador para lograr un volumen objetivo con la incubación del reactivo de, por ejemplo, de aproximadamente 10 ml a aproximadamente 200 ml, o de aproximadamente 20 ml a aproximadamente 125 ml, tal como al menos o aproximadamente al menos 10 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml, 50 ml, 60 ml, 70 ml, 80 ml, 90 ml, 100 ml, 105 ml, 110 ml, 115 ml, 120 ml, 125 ml, 130 ml, 135 ml, 140 ml, 145 ml, 150 ml, 160 ml, 170 ml, 180 ml, 190 ml o 200 ml. En algunos casos, el tampón de incubación y el agente estimulador se mezclan previamente antes de añadirlos a las células. En algunos casos, el tampón de incubación y el agente estimulador se añaden por separado a las células. En algunos casos, la incubación de estimulación se lleva a cabo en condiciones periódicas de mezcla suave, que pueden ayudar a promover interacciones energéticamente favorecidas y, de este modo, permitir el uso de menos agente estimulador en general a la vez que se consigue la estimulación y activación de las células.

En algunos casos, la incubación se realiza generalmente en condiciones de mezcla, tal como en presencia de rotación, generalmente a una fuerza o velocidad relativamente bajas, tal como una velocidad inferior a la utilizada para granular las células, tal como de 600 rpm a 1700 rpm o de aproximadamente 600 rpm a aproximadamente 1700 rpm (p. ej., a o aproximadamente o al menos 600 rpm, 1000 rpm, o 1500 rpm o 1700 rpm), tal como a una FCR en la muestra o en la pared de la cámara u otro recipiente de 80 g a 100 g o de aproximadamente 80 g a aproximadamente 100 g (p. ej., a o aproximadamente o al menos 80 g, 85 g, 90 g, 95 g o 100 g). En algunos casos, el giro se realiza mediante intervalos repetidos de un giro a una velocidad tan baja seguido de un periodo de descanso, tal como un giro y/o

descanso durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 segundos, tal como un giro de aproximadamente 1 o 2 segundos seguido de un descanso de aproximadamente 5, 6, 7 u 8 segundos.

- En algunos casos, la duración total de la incubación, p. ej., con el agente estimulador, está comprendida entre 1 hora y 96 horas, 1 hora y 72 horas, 1 hora y 48 horas, 4 horas y 36 horas, 8 horas y 30 horas, 18 horas y 30 horas o 12 horas y 24 horas, tal como al menos o aproximadamente al menos o aproximadamente 6 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas o 72 horas. En algunos casos, la incubación adicional se realiza durante un tiempo comprendido entre 1 hora y 48 horas, 4 horas y 36 horas, 8 horas y 30 horas o 12 horas y 24 horas, ambos inclusive.
- En algunos casos, las células se cultivan y/o incubados en condiciones de estimulación antes y/o durante una etapa de introducción de un polinucleótido, p. ej., un polinucleótido que codifica un receptor recombinante, a las células, p. ej., mediante transducción y/o transfección, tal como se describe en la Sección I-C. En algunos casos, las células se cultivan y/o incuban en condiciones de estimulación durante un tiempo comprendido entre 30 minutos y 2 horas, entre 1 hora y 8 horas, entre 1 hora y 6 horas, entre 6 horas y 12 horas, entre 12 horas y 18 horas, entre 16 horas y 24 horas, entre 12 horas y 36 horas, entre 24 horas y 48 horas, entre 24 horas y 72 horas, entre 42 horas y 54 horas, entre 60 horas y 120 horas entre 96 horas y 120 horas, entre 90 horas y entre 1 y 7 días, entre 3 días y 8 días, entre 1 día y 3 días, entre 4 días y 6 días, o entre 4 días y 5 días antes de la modificación genética. En algunos casos, las células se incuban durante o aproximadamente 2 días antes de la modificación genética.
- En determinados casos, las células se incuban con y/o en presencia del reactivo estimulador antes de y/o durante la modificación genética de las células. En ciertos casos, las células se incuban con y/o en presencia del reactivo estimulador durante un periodo de tiempo comprendido entre 12 y 36 horas, entre 24 horas y 48 horas, entre 24 horas y 72 horas, entre 42 horas y 54 horas, entre 60 horas y 120 horas entre 96 horas y 120 horas, entre 90 horas y entre 2 y 7 días, entre 3 días y 8 días, entre 1 día y 8 días, entre 4 días y 6 días, o entre 4 días y 5 días. En casos particulares, las células se cultivan y/o incuban en condiciones de estimulación antes y/o durante la modificación genética de las células durante un periodo de tiempo inferior a 10 días, 9 días, 8 días, 7 días, 6 días o 5 días, 4 días, o durante un periodo de tiempo inferior a 168 horas, 162 horas, 156 horas, 144 horas, 138 horas, 132 horas, 120 horas, 114 horas, 108 horas, 102 horas u 96 horas. En casos particulares, las células se incuban con y/o en presencia del reactivo estimulador durante o durante aproximadamente 4 días, 5 días, 6 días o 7 días. En algunos casos, las células se incuban con y/o en presencia del reactivo estimulador durante o durante aproximadamente 4 días. En casos particulares, las células se incuban con y/o en presencia del reactivo estimulador durante o durante aproximadamente 5 días. En determinados casos, las células se incuban con y/o en presencia del reactivo estimulador durante menos de 7 días.
- En algunos casos, la incubación de las células en condiciones de estimulación incluye la incubación de las células con un reactivo estimulador que se describe en la Sección I-B-1. En algunos casos, el reactivo estimulador contiene o incluye una perla, tal como una perla paramagnética, y las células se incuban con el reactivo estimulador en una proporción inferior a 3:1 (perlas:células), tal como una proporción de 1:1. En casos particulares, las células se incuban con el reactivo estimulador en presencia de una o más citocinas y/o uno o más antioxidantes. En algunos casos, una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos se incuba con el reactivo estimulador en una proporción de 1:1 (perlas:células) en presencia de IL-2, IL-7, IL-15 recombinantes y NAC. En determinados casos, una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos se incuba con el reactivo estimulador en una proporción de 1:1 (perlas:células) en presencia de IL-2, IL-15 recombinantes y NAC. En algunos casos, el reactivo estimulador se elimina y/o se separa de las células a los, dentro de, o dentro de aproximadamente 6 días, 5 días, o 4 días desde el inicio o comienzo de la incubación, p. ej., desde el momento en que el reactivo estimulador se añade a las células o entra en contacto con ellas.

### 1. Reactivos estimuladores

- En algunos casos, incubar una composición de células enriquecidas en condiciones de estimulación es o incluye incubar y/o poner en contacto la composición de células enriquecidas con un reactivo estimulador capaz de activar y/o expandir los linfocitos T. En algunos casos, el reactivo estimulador es capaz de estimular y/o activar una o más señales en las células. En algunos casos, la una o más señales están mediadas por un receptor. En casos particulares, la una o más señales son o están asociadas con un cambio en la transducción de señales y/o un nivel o cantidad de mensajeros secundarios, p. ej., AMPc y/o calcio intracelular, un cambio en la cantidad, localización celular, conformación, fosforilación, ubiquitinación, y/o truncamiento de una o más proteínas celulares, y/o un cambio en una actividad celular, p. ej., transcripción, traducción, degradación de proteínas, morfología celular, estado de activación y/o división celular. En casos particulares, el reactivo estimulador activa y/o es capaz de activar uno o más dominios de señalización intracelular de uno o más componentes de un complejo TCR y/o uno o más dominios de señalización intracelular de una o más moléculas coestimuladoras.

- En determinados casos, el reactivo estimulador contiene una partícula, p. ej., una perla, que está conjugada o unida a uno o más agentes, p. ej., biomoléculas, capaces de activar y/o expandir las células, p. ej., linfocitos T. En algunos casos, el uno o más agentes están unidos a una perla. En algunos casos, la perla es biocompatible, es decir, está compuesta de un material apto para uso biológico. En algunos casos, las perlas no son tóxicas para las células cultivadas, p. ej., linfocitos T cultivados. En algunos casos, las perlas pueden ser cualquier partícula capaz de unir

agentes de forma que permitan una interacción entre el agente y una célula.

En algunos casos, un reactivo estimulador contiene uno o más agentes capaces de activar y/o expandir las células, p. ej., linfocitos T, que están ligadas o unidas de otro modo a una perla, por ejemplo, a la superficie de la perla. En determinados casos, la perla es una partícula no celular. En casos particulares, la perla puede incluir una partícula coloidal, una microesfera, nanopartícula, una perla magnética o similar. En algunos casos, las perlas son perlas de agarosa. En determinados casos, las perlas son de sefarosa.

En casos particulares, el reactivo estimulador contiene perlas monodispersas. En determinados casos, las perlas que son monodispersas comprenden dispersiones de tamaño que tienen una desviación estándar de diámetro de menos del 5 % entre sí.

En algunos casos, la perla contiene uno o más agentes, tal como un agente que está acoplado, conjugado o conectado (directa o indirectamente) a la superficie de la perla. En algunos casos, un agente como se contempla en el presente documento puede incluir, aunque no de forma limitativa, ARN, ADN, proteínas (p. ej., enzimas), antígenos, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpo, hidratos de carbono, lípidos, lectinas, o cualquier otra biomolécula con afinidad por una diana deseada. En algunos casos, la diana deseada es un receptor de linfocitos T y/o un componente de un receptor de linfocitos T. En determinados casos, la diana deseada es CD3. En un determinado caso, la diana deseada es una molécula coestimuladora de linfocitos T, p. ej., CD28, CD137(4-1-BB), OX40 o ICOS. El uno o más agentes pueden estar unidos directa o indirectamente a la perla mediante diversos métodos conocidos y disponibles en la técnica. La unión puede ser covalente, no covalente, electrostática o hidrofóbica, y puede lograrse mediante diversos medios de unión, incluyendo, por ejemplo, un medio químico, un medio mecánico o un medio enzimático. En algunos casos, una biomolécula (p. ej., un anticuerpo anti-CD3 biotinilado) puede estar unido indirectamente a la perla a través de otra biomolécula (p. ej., un anticuerpo anti-biotina) que esté unida directamente a la perla.

En algunos casos, el reactivo estimulador contiene una perla y uno o más agentes que interactúan directamente con una macromolécula de la superficie de una célula. En determinados casos, la perla (p. ej., una perla paramagnética) interactúa con una célula a través de uno o más agentes (p. ej., un anticuerpo) específicos para una o más macromoléculas de la célula (p. ej., una o más proteínas de la superficie celular). En determinados casos, la perla (p. ej., una perla paramagnética) está marcada con un primer agente descrito en el presente documento, tal como un anticuerpo primario (p. ej., un anticuerpo anti-biotina) u otra biomolécula y, a continuación, se añade un segundo agente, tal como un anticuerpo secundario (p. ej., un anticuerpo anti-CD3 biotinilado) u otra segunda biomolécula (p. ej., estreptavidina), de modo que el anticuerpo secundario u otra segunda biomolécula se une específicamente a dichos anticuerpos primarios u otra biomolécula en la partícula.

En algunos casos, el reactivo estimulador contiene uno o más agentes (p. ej., un anticuerpo) que está unido a una perla (p. ej., una perla paramagnética) y se une específicamente a una o más de las siguientes macromoléculas de una célula (p. ej., un linfocito T): CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD25, CD27, CD28, CD29, CD31, CD44, CD45RA, CD45RO, CD54(ICAM-1), CD127, MHCII, CTLA-4, ICOS, PD-1, OX40, CD27L(CD70), 4-1BB(CD137), 4-1BBL, CD30L, LIGHT, IL-2R, IL-12R, IL-1R, IL-15R; IFN-gammaR, TNF-alfaR, IL-4R, IL-10R, CD18/CD11a (LFA-1), CD62L (L-selectina), CD29/CD49d (VLA-4), Ligando Notch (p. ej., tipo Delta 1/4, Jagged 1/2, etc.), CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7 y CXCR3 o fragmentos de los mismos, incluidos los ligandos correspondientes a estas macromoléculas o fragmentos de las mismas. En algunos casos, un agente (p. ej., un anticuerpo) unido a la perla se une específicamente a una o más de las siguientes macromoléculas de una célula (p. ej., un linfocito T): CD28, CD62L, CCR7, CD27, CD127, CD3, CD4, CD8, CD45RA y/o CD45RO.

En algunos casos, uno o más de los agentes unidos a la perla es un anticuerpo. El anticuerpo puede incluir un anticuerpo policlonal, anticuerpo monoclonal (incluidos anticuerpos de longitud completa que tienen una región Fc de inmunoglobulina), composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica, anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos, diacuerpos y moléculas monocatenarias, así como fragmentos de anticuerpo (p. ej., Fab, F(ab')<sub>2</sub> y Fv). En algunos casos, el reactivo estimulador es un fragmento de anticuerpo (incluido el fragmento de unión a antígeno), p. ej., un fragmento Fab, Fab'-SH, Fv, scFv o (Fab')<sub>2</sub>. Se apreciará que pueden utilizarse regiones constantes de cualquier isotipo para los anticuerpos contemplados en el presente documento, incluyendo IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, y que dichas regiones constantes pueden obtenerse de cualquier especie humana o animal (p. ej., especies murinas). En algunos casos, el agente es un anticuerpo que se une y/o reconoce uno o más componentes de un receptor de linfocitos T. En casos particulares, el agente es un anticuerpo anti-CD3. En determinados casos, el agente es un anticuerpo que se une a y/o reconoce un correceptor. En algunos casos, el reactivo estimulador comprende un anticuerpo anti-CD28. En algunos casos, la perla tiene un diámetro superior a aproximadamente 0,001 µm, superior a aproximadamente 0,01 µm, superior a aproximadamente 0,1 µm, superior a aproximadamente 1,0 µm, superior a aproximadamente 10 µm, superior a aproximadamente 50 µm, superior a aproximadamente 100 µm o superior a aproximadamente 1000 µm y no superior a aproximadamente 1500 µm. En algunos casos, la perla tiene un diámetro de aproximadamente 1,0 µm a aproximadamente 500 µm, de aproximadamente 1,0 µm a aproximadamente 150 µm, de aproximadamente 1,0 µm a aproximadamente 30 µm, de aproximadamente 1,0 µm a aproximadamente 10 µm, de aproximadamente 1,0 µm a aproximadamente 5,0 µm, de aproximadamente 2,0 µm a aproximadamente 5,0 µm o de aproximadamente 3,0 µm a aproximadamente 5,0 µm. En algunos casos, la perla tiene un diámetro de



aproximadamente 3  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ . En algunos casos, la perla tiene un diámetro de al menos o al menos aproximadamente 0,001  $\mu\text{m}$ , 0,01  $\mu\text{m}$ , 0,1  $\mu\text{m}$ , 0,5  $\mu\text{m}$ , 1,0  $\mu\text{m}$ , 1,5  $\mu\text{m}$ , 2,0  $\mu\text{m}$ , 2,5  $\mu\text{m}$ , 3,0  $\mu\text{m}$ , 3,5  $\mu\text{m}$ , 4,0  $\mu\text{m}$ , 4,5  $\mu\text{m}$ , 5,0  $\mu\text{m}$ , 5,5  $\mu\text{m}$ , 6,0  $\mu\text{m}$ , 6,5  $\mu\text{m}$ , 7,0  $\mu\text{m}$ , 7,5  $\mu\text{m}$ , 8,0  $\mu\text{m}$ , 8,5  $\mu\text{m}$ , 9,0  $\mu\text{m}$ , 9,5  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$ , 12  $\mu\text{m}$ , 14  $\mu\text{m}$ , 16  $\mu\text{m}$ , 18  $\mu\text{m}$  o 20  $\mu\text{m}$ . En determinados casos, la perla tiene un diámetro de o aproximadamente 4,5  $\mu\text{m}$ . En determinados casos, la perla tiene un diámetro de o aproximadamente 2,8  $\mu\text{m}$ .

En algunos casos, las perlas tienen una densidad superior a 0,001  $\text{g/cm}^3$ , superior a 0,01  $\text{g/cm}^3$ , superior a 0,05  $\text{g/cm}^3$ , superior a 0,1  $\text{g/cm}^3$ , superior a 0,5  $\text{g/cm}^3$ , superior a 0,6  $\text{g/cm}^3$ , superior a 0,7  $\text{g/cm}^3$ , superior a 0,8  $\text{g/cm}^3$ , superior a 0,9  $\text{g/cm}^3$ , superior a 1  $\text{g/cm}^3$ , superior a 1,1  $\text{g/cm}^3$ , superior a 1,2  $\text{g/cm}^3$ , superior a 1,3  $\text{g/cm}^3$ , superior a 1,4  $\text{g/cm}^3$ , superior a 1,5  $\text{g/cm}^3$ , superior a 2  $\text{g/cm}^3$ , superior a 3  $\text{g/cm}^3$ , superior a 4  $\text{g/cm}^3$ , o superior a 5  $\text{g/cm}^3$ . En algunos casos, las perlas tienen una densidad comprendida entre aproximadamente 0,001  $\text{g/cm}^3$  y aproximadamente 100  $\text{g/cm}^3$ , aproximadamente 0,01  $\text{g/cm}^3$  y aproximadamente 50  $\text{g/cm}^3$ , aproximadamente 0,1  $\text{g/cm}^3$  y aproximadamente 10  $\text{g/cm}^3$ , aproximadamente 0,1  $\text{g/cm}^3$  y aproximadamente 0,5  $\text{g/cm}^3$ , aproximadamente 0,5  $\text{g/cm}^3$  y aproximadamente 1  $\text{g/cm}^3$ , aproximadamente 0,5  $\text{g/cm}^3$  y aproximadamente 1,5  $\text{g/cm}^3$ , aproximadamente 1  $\text{g/cm}^3$  y aproximadamente 1,5  $\text{g/cm}^3$ , aproximadamente 1  $\text{g/cm}^3$  y aproximadamente 2  $\text{g/cm}^3$ , o aproximadamente 1  $\text{g/cm}^3$  y aproximadamente 5  $\text{g/cm}^3$ . En algunos casos, las perlas tienen una densidad de aproximadamente 0,5  $\text{g/cm}^3$ , aproximadamente 0,5  $\text{g/cm}^3$ , aproximadamente 0,6  $\text{g/cm}^3$ , aproximadamente 0,7  $\text{g/cm}^3$ , aproximadamente 0,8  $\text{g/cm}^3$ , aproximadamente 0,9  $\text{g/cm}^3$ , aproximadamente 1,0  $\text{g/cm}^3$ , aproximadamente 1,1  $\text{g/cm}^3$ , aproximadamente 1,2  $\text{g/cm}^3$ , aproximadamente 1,3  $\text{g/cm}^3$ , aproximadamente 1,4  $\text{g/cm}^3$ , aproximadamente 1,5  $\text{g/cm}^3$ , aproximadamente 1,6  $\text{g/cm}^3$ , aproximadamente 1,7  $\text{g/cm}^3$ , aproximadamente 1,8  $\text{g/cm}^3$ , aproximadamente 1,9  $\text{g/cm}^3$  o aproximadamente 2,0  $\text{g/cm}^3$ . En determinados casos, las perlas tienen una densidad de aproximadamente 1,6  $\text{g/cm}^3$ . En casos particulares, las perlas o partículas tienen una densidad de aproximadamente 1,5  $\text{g/cm}^3$ . En determinados casos, las partículas tienen una densidad de aproximadamente 1,3  $\text{g/cm}^3$ .

En determinados casos, una pluralidad de las perlas tiene una densidad uniforme. En determinados casos, una densidad uniforme comprende una desviación típica de la densidad inferior al 10 %, inferior al 5 %, o inferior al 1 % de la densidad media de las perlas.

En algunos casos, las perlas tienen una superficie de entre aproximadamente 0,001  $\text{m}^2$  por cada gramo de partículas ( $\text{m}^2/\text{g}$ ) y aproximadamente 1.000  $\text{m}^2/\text{g}$ , de aproximadamente 0,010  $\text{m}^2/\text{g}$  a aproximadamente 100  $\text{m}^2/\text{g}$ , de aproximadamente 0,1  $\text{m}^2/\text{g}$  a aproximadamente 10  $\text{m}^2/\text{g}$ , de aproximadamente 0,1  $\text{m}^2/\text{g}$  a aproximadamente 1  $\text{m}^2/\text{g}$ , de aproximadamente 1  $\text{m}^2/\text{g}$  a aproximadamente 10  $\text{m}^2/\text{g}$ , de aproximadamente 10  $\text{m}^2/\text{g}$  a aproximadamente 100  $\text{m}^2/\text{g}$ , de aproximadamente 0,5  $\text{m}^2/\text{g}$  a aproximadamente 20  $\text{m}^2/\text{g}$ , de aproximadamente 0,5  $\text{m}^2/\text{g}$  a aproximadamente 5  $\text{m}^2/\text{g}$ , o de aproximadamente 1  $\text{m}^2/\text{g}$  a aproximadamente 4  $\text{m}^2/\text{g}$ . En algunos casos, las partículas o perlas tienen una superficie de aproximadamente 1  $\text{m}^2/\text{g}$  a aproximadamente 4  $\text{m}^2/\text{g}$ .

En algunos casos, la perla contiene al menos un material en la superficie de la perla o cerca de ella que puede acoplarse, asociarse o conjugarse con un anticuerpo. En algunos casos, la perla está funcionalizada en superficie, es decir, comprende grupos funcionales capaces de formar un enlace covalente con una molécula de enlace, p. ej., un polinucleótido o un polipéptido. En casos particulares, la perla comprende grupos carboxilo, amino, hidroxilo, tosilo, epoxi, y/o clorometilo expuestos en la superficie. En casos particulares, las perlas comprenden agarosa y/o sefarosa expuestas en la superficie. En determinados casos, la superficie de la perla comprende reactivos estimuladores unidos que pueden unir o asociar moléculas de unión. En casos particulares, las biomoléculas son polipéptidos. En algunos casos, las perlas comprenden proteína A, proteína G, o biotina expuesta en la superficie.

En algunos casos, la perla reacciona en un campo magnético. En algunos casos, la perla es una perla magnética. En algunos casos, la perla magnética es paramagnética. En casos particulares, la perla magnética es superparamagnética. En determinados casos, las perlas no muestran ninguna propiedad magnética a menos que se expongan a un campo magnético.

En casos particulares, la perla comprende un núcleo magnético, un núcleo paramagnético, o un núcleo superparamagnético. En algunos casos, el núcleo magnético contiene un metal. En algunos casos, el metal puede ser, aunque no de forma limitativa, hierro, níquel, cobre, cobalto, gadolinio, manganeso, tántalo, zinc, circonio o cualquier combinación de los mismos. En determinados casos, el núcleo magnético comprende óxidos metálicos (p. ej., óxidos de hierro), ferritas (p. ej., ferritas de manganeso, ferritas de cobalto, ferritas de níquel, etc.), hematites y aleaciones metálicas (p. ej., CoTaZn). En algunos casos, el núcleo magnético comprende una o más ferritas, un metal, una aleación metálica, un óxido de hierro, o dióxido de cromo. En algunos casos, el núcleo magnético comprende hierro elemental o un compuesto del mismo. En algunos casos, el núcleo magnético comprende uno o más de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), maghemita ( $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) o greigita ( $\text{Fe}_3\text{S}_4$ ). En algunos casos, el núcleo interno comprende un óxido de hierro (p. ej.,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ).

En determinados casos, la perla contiene un núcleo magnético, paramagnético y/o superparamagnético que está cubierto por una capa o revestimiento funcionalizado superficialmente. En algunos casos, la capa puede contener un material que puede incluir, aunque no de forma limitativa, un polímero, un polisacárido, una sílice, un ácido graso, una proteína, un carbón, agarosa, sefarosa, o una combinación de los mismos. En algunos casos, el polímero puede ser un polietilenglicol, poli(ácido láctico-co-glicólico), poliglutaraldehído, poliuretano, poliestireno, o un alcohol polivinílico.

En determinados casos, la capa o revestimiento exterior comprende poliestireno. En casos particulares, el revestimiento exterior está funcionalizado en superficie.

En algunos casos, el reactivo estimulador comprende una perla que contiene un núcleo de óxido metálico (p. ej., un núcleo de óxido de hierro) y una capa, en donde el núcleo de óxido metálico comprende al menos un polisacárido (p. ej., dextrano), y en donde la capa comprende al menos un polisacárido (p. ej., amino dextrano), al menos un polímero (p. ej., poliuretano) y sílice. En algunos casos, el núcleo de óxido metálico es un núcleo de óxido de hierro coloidal. En determinados casos, el uno o más agentes incluyen un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En casos particulares, el uno o más agentes incluyen un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28. En algunos casos, el reactivo estimulador comprende un anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD28 y un anticuerpo anti-biotina. En algunos casos, el reactivo estimulador comprende un anticuerpo anti-biotina. En algunos casos, la perla tiene un diámetro de aproximadamente 3  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ . En algunos casos, la perla tiene un diámetro de aproximadamente 3  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ . En determinados casos, la perla tiene un diámetro de aproximadamente 3,5  $\mu\text{m}$ .

En algunos casos, el reactivo estimulador comprende uno o más agentes que están unidos a una perla que comprende un núcleo de óxido metálico (p. ej., un núcleo interno de óxido de hierro) y una capa (p. ej., una capa protectora), en donde la capa comprende poliestireno. En determinados casos, las perlas son perlas paramagnéticas (p. ej., superparamagnéticas) monodispersas que comprenden un núcleo de hierro paramagnético (p. ej., superparamagnético), p. ej., un núcleo que comprende magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) y/o maghemita ( $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) y una capa o recubrimiento de poliestireno. En algunos casos, la perla no es porosa. En algunos casos, las perlas contienen una superficie funcionalizada a la que se unen uno o más agentes. En determinados casos, el uno o más agentes se unen covalentemente a las perlas en la superficie. En algunos casos, el uno o más agentes incluyen un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos casos, el uno o más agentes incluyen un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28. En algunos casos, el reactivo estimulador es o comprende perlas magnéticas anti-CD3/anti-CD28. En algunos casos, los uno o más agentes incluyen un anticuerpo anti-CD3 y/o un anticuerpo anti-CD28, y un anticuerpo o fragmento de antígeno del mismo capaz de unirse a un anticuerpo marcado (p. ej., anticuerpo biotinilado), tal como un anticuerpo anti-CD3 o anti-CD28 marcado. En determinados casos, las perlas tienen una densidad de aproximadamente 1,5  $\text{g/cm}^3$  y una superficie de aproximadamente 1  $\text{m}^2/\text{g}$  a aproximadamente 4  $\text{m}^2/\text{g}$ . En casos particulares, las perlas son perlas superparamagnéticas monodispersas que tienen un diámetro de aproximadamente 4,5  $\mu\text{m}$  y una densidad de aproximadamente 1,5  $\text{g/cm}^3$ . En algunos casos, las perlas son perlas superparamagnéticas monodispersas que tienen un diámetro medio de aproximadamente 2,8  $\mu\text{m}$  y una densidad de aproximadamente 1,3  $\text{g/cm}^3$ .

En algunos casos, la composición de linfocitos T enriquecidos se incuba con el reactivo estimulador en una proporción entre perlas y células de aproximadamente 3:1, 2,5:1, 2:1, 1,5:1, 1,25:1, 1,2:1, 1,1:1, 1:1, 0,9:1, 0,8:1, 0,75:1, 0,67:1, 0,5:1, 0,3:1, o 0,2:1. En casos particulares, la proporción entre perlas y células es de entre 2,5:1 y 0,2:1, entre 2:1 y 0,5:1, entre 1,5:1 y 0,75:1, entre 1,25:1 y 0,8:1, entre 1,1:1 y 0,9:1. En casos particulares, la proporción entre el reactivo estimulador y las células es de aproximadamente 1:1 o es 1:1.

## 2. Eliminación del reactivo estimulador de las células

En determinados casos, el reactivo estimulador, p. ej., perlas magnéticas anti-CD3/anti-CD28, se elimina y/o se separa de las células. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, casos particulares contemplan que la unión y/o asociación entre un reactivo estimulador y las células puede, en algunas circunstancias, reducirse con el tiempo durante la incubación. En determinados casos, pueden añadirse uno o más agentes para reducir la unión y/o asociación entre el reactivo estimulador y las células. En casos particulares, un cambio en las condiciones de cultivo celular, p. ej., temperatura media del pH, puede reducir la unión y/o asociación entre el reactivo estimulador y las células. Por lo tanto, en algunos casos, el reactivo estimulador puede eliminarse de una incubación, sistema de cultivo celular, y/o una solución separada de las células, p. ej., sin retirar las células de la incubación, sistema de cultivo celular, y/o también una solución.

Se conocen métodos para eliminar de las células reactivos estimuladores (p. ej., reactivos estimuladores que son o contienen partículas, tales como partículas de perlas o partículas magnetizables). En algunos casos, el uso de anticuerpos competidores, tales como anticuerpos no marcados, pueden usarse, los cuales, por ejemplo, se unen a un anticuerpo primario del reactivo estimulador y alteran su afinidad por su antígeno en la célula, permitiendo así un desprendimiento suave. En algunos casos, después del desprendimiento, los anticuerpos competidores pueden permanecer asociados a la partícula (p. ej., partícula de perla) mientras que el anticuerpo que no ha reaccionado es o puede ser lavado y la célula queda libre del anticuerpo de aislamiento, selección, enriquecimiento y/o activación. Un ejemplo de dicho reactivo es DETACaBEAD (Friedl *et al.* 1995; Entschladen *et al.* 1997). En algunos casos, las partículas (p. ej., partículas de perla) pueden eliminarse en presencia de un enlazador escindible (p. ej., enlazador de ADN), de modo que los anticuerpos unidos a partículas se conjugan con el enlazador (p. ej., CELlection, Dynal). En algunos casos, la región enlazadora proporciona un sitio escindible para eliminar las partículas (p. ej., partículas de perla) de las células tras el aislamiento, por ejemplo, mediante la adición de ADNasa u otro tampón de liberación. En algunos casos, también pueden emplearse otros métodos enzimáticos para la liberación de una partícula (p. ej., una partícula de perla) de las células. En algunos casos, las partículas (p. ej., partículas de perla o partículas

magnetizables) son biodegradables.

En algunos casos, el reactivo estimulador es magnético, paramagnético, y/o superparamagnético, y/o contiene una perla que es magnética, paramagnética y/o superparamagnética, y el reactivo estimulador puede eliminarse de las células exponiéndolas a un campo magnético. Algunos ejemplos de equipos adecuados que contienen imanes para generar el campo magnético incluyen DynaMag CTS (Thermo Fisher), Magnetic Separator (Takara) y EasySep Magnet (Stem Cell Technologies).

En casos particulares, el reactivo estimulador se elimina o separa de las células antes de completar los métodos divulgados, p. ej., antes de la cosecha, recogida y/o formulación de células modificadas genéticamente producidas por los métodos descritos en el presente documento. En algunos casos, el reactivo estimulador se elimina y/o se separa de las células antes de la modificación genética, p. ej., transducción o transfección, de las células. En casos particulares, el reactivo estimulador se elimina y/o se separa de las células después de la etapa de modificación genética de las células. En determinados casos, el reactivo estimulador se elimina antes del cultivo de las células, p. ej., antes del cultivo de las células modificadas genéticamente, p. ej., transfectadas o transducidas, en condiciones que promuevan la proliferación y/o expansión.

En determinados casos, el reactivo estimulador se separa y/o se elimina de las células después de un cierto tiempo. En casos particulares, el tiempo es el tiempo desde el comienzo y/o inicio de la incubación en condiciones de estimulación. En casos particulares, el inicio de la incubación se considera en el momento o aproximadamente en el momento en que las células entran en contacto con el reactivo estimulador y/o un medio o solución que contenga el reactivo estimulador. En casos particulares, el reactivo estimulador se elimina o se separa de las células en un plazo de aproximadamente 10 días, 9 días, 8 días, 7 días, 6 días, 5 días, 4 días, 3 días, o 2 días después del inicio o comienzo de la incubación. En casos particulares, el reactivo estimulador se elimina y/o se separa de las células a o aproximadamente los 9 días, 8 días, 7 días, 6 días, 5 días, 4 días, 3 días, o 2 días después del inicio o comienzo de la incubación. En determinados casos, el reactivo estimulador se elimina y/o se separa de las células a o aproximadamente las 168 horas, 162 horas, 156 horas, 144 horas, 138 horas, 132 horas, 120 horas, 114 horas, 108 horas, 102 horas, o 96 horas después del inicio o comienzo de la incubación. En casos particulares, el reactivo estimulador se elimina y/o se separa de las células a o aproximadamente los 5 días después del inicio y/o comienzo de la incubación. En algunos casos, el reactivo estimulador se elimina y/o se separa de las células a o aproximadamente los 4 días después del inicio y/o comienzo de la incubación.

### C. Células modificadas genéticamente

En algunos casos, los métodos divulgados implican administrar a un sujeto que padece una enfermedad o afección células que expresan un receptor de antígeno recombinante. Diversos métodos para la introducción de componentes transgénicos, p. ej., receptores recombinantes, p. ej., CAR o TCR, son bien conocidos y se pueden usar con los métodos y composiciones divulgados. Los métodos ilustrativos incluyen aquellos para la transferencia de ácidos nucleicos que codifican los receptores, incluyendo víricos, p. ej., retrovíricos o lentivíricos, transducción, transposones y electroporación.

Entre las células que expresan los receptores y que se administran mediante los métodos divulgados se encuentran las células modificadas genéticamente. La modificación genética generalmente implica la introducción de un ácido nucleico que codifica el componente recombinante modificado genéticamente en una composición que contiene las células, tal como por transducción retroviral, transfección o transformación.

En algunos casos, los métodos divulgados en el presente documento se utilizan con relación a la modificación genética de una o más composiciones de linfocitos T enriquecidos. En determinados casos, la modificación genética es o incluye la introducción de un polinucleótido, p. ej., un polinucleótido recombinante que codifica una proteína recombinante. En casos particulares, las proteínas recombinantes son receptores recombinantes, tales como los descritos en la Sección II. La introducción de las moléculas de ácido nucleico que codifican la proteína recombinante, tales como el receptor recombinante, en la célula puede llevarse a cabo utilizando cualquiera de una serie de vectores conocidos. Dichos vectores incluyen sistemas víricos y no víricos, incluidos los sistemas lentivíricos y gammaretrovíricos, así como los sistemas basados en transposones, tales como los sistemas de transferencia de genes basados en PiggyBac o Bella Durmiente. Los métodos ilustrativos incluyen aquellos para la transferencia de ácidos nucleicos que codifican los receptores, incluyendo víricos, p. ej., retrovíricos o lentivíricos, transducción, transposones y electroporación. En algunos casos, la modificación genética produce una o más composiciones de linfocitos T enriquecidos modificados genéticamente.

En determinados casos, una o más composiciones de linfocitos T enriquecidos modificados genéticamente, p. ej., transducidos o transfectados, antes de cultivar las células, p. ej., en condiciones que promueven la proliferación y/o expansión, tal como mediante un método proporcionado en la Sección I-D. En casos particulares, una o más composiciones de linfocitos T enriquecidos se modifican genéticamente después de que la una o más composiciones hayan sido estimuladas, activadas y/o incubadas en condiciones de estimulación, tales como las descritos en los métodos de la Sección I.B. En casos particulares, la una o más composiciones son composiciones estimuladas. En casos particulares, la una o más composiciones estimuladas han sido previamente criopreservadas y almacenadas, y

se descongelan antes de la modificación genética.

En determinados casos, la una o más composiciones de linfocitos T estimulados son o incluyen dos composiciones de linfocitos T enriquecidos estimulados separadas. En casos particulares, dos composiciones de linfocitos T enriquecidos separadas, p. ej., dos composiciones de linfocitos T enriquecidos separadas que han sido seleccionadas, aisladas y/o enriquecidas a partir de la misma muestra biológica, se modifican genéticamente por separado. En determinados casos, las dos composiciones separadas incluyen una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos. En casos particulares, las dos composiciones separadas incluyen una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos. En algunos casos, dos composiciones de linfocitos T CD4+ enriquecidos y linfocitos T CD8+ enriquecidos separadas, tal como tras la incubación en las condiciones de estimulación descritas anteriormente, se modifican genéticamente por separado. En algunos casos, una única composición de linfocitos T enriquecidos se modifica genéticamente. En determinados casos, la composición única es una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos. En algunos casos, la composición única es una composición de linfocitos T CD4+ y CD8+ enriquecidos que se han combinado a partir de composiciones separadas antes de la modificación genética.

En algunos casos, la composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos, tal como los linfocitos T CD4+ estimulados, que han sido modificados genéticamente, p. ej., transducidos o transfectados, incluye al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 %, al menos un 99,9 %, o un o aproximadamente un 100 % de linfocitos T CD4+. En determinados casos, la composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos, tal como los linfocitos T CD4+ estimulados, que han sido modificados genéticamente incluye menos del 40 %, menos del 35 %, menos del 30 %, menos del 25 %, menos del 20 %, menos del 15 %, menos del 10 %, menos del 5 %, menos del 1 %, menos del 0,1 %, o menos del 0,01 % de linfocitos T CD8+, y/o no contiene linfocitos T CD8+, y/o está exenta o sustancialmente exenta de linfocitos T CD8+.

En algunos casos, la composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos, tal como los linfocitos T CD8+ estimulados, que han sido modificados genéticamente, p. ej., transducidos o transfectados, incluye al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 %, al menos un 99,9 %, o un o aproximadamente un 100 % de linfocitos T CD8+. En determinados casos, la composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos, tal como los linfocitos T CD8+ estimulados, que han sido modificados genéticamente incluye menos del 40 %, menos del 35 %, menos del 30 %, menos del 25 %, menos del 20 %, menos del 15 %, menos del 10 %, menos del 5 %, menos del 1 %, menos del 0,1 %, o menos del 0,01 % de linfocitos T CD4+, y/o no contiene linfocitos T CD4+, y/o está exenta o sustancialmente exenta de linfocitos T CD4+.

En algunos casos, las composiciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ enriquecidos separadas se combinan en una única composición y se modifican genéticamente, p. ej., se transducen o transfectan. En determinados casos, las composiciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ enriquecidos separadas se combinan en una única composición una vez realizada y/o completada la modificación genética. En casos particulares, las composiciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ enriquecidos separadas, tales como composiciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ estimulados separadas se obtienen por separado y se procesan por separado para el cultivo y/o expansión de linfocitos T después de que se haya realizado y/o completado la modificación genética.

En algunos casos, la introducción de un polinucleótido, p. ej., un polinucleótido recombinante que codifica una proteína recombinante, se lleva a cabo poniendo en contacto linfocitos T CD4+ o CD8+ enriquecidos, tales como linfocitos T CD4+ o CD8+ estimulados, con una partícula vírica que contenga el polinucleótido. En algunos casos, el contacto puede efectuarse con centrifugación, tal como la espinoculación (p. ej., inoculación centrífuga). En algunos casos, la composición que contiene células, partículas víricas y reactivo pueden girar, generalmente a una fuerza o velocidad relativamente bajas, tal como una velocidad inferior a la utilizada para granular las células, tal como de 600 rpm a 1700 rpm o de aproximadamente 600 rpm a aproximadamente 1700 rpm (p. ej., a o aproximadamente o al menos 600 rpm, 1000 rpm, o 1500 rpm o 1700 rpm). En algunos casos, la rotación se lleva a una fuerza, p. ej., una fuerza centrífuga relativa, de 100 g a 3200 g o de aproximadamente 100 g a aproximadamente 3200 g (p. ej., a o aproximadamente o al menos a o aproximadamente de 100 g, 200 g, 300 g, 400 g, 500 g, 1000 g, 1500 g, 2000 g, 2500 g, 3000 g o 3200 g), tal como a o aproximadamente de 693 g, medido por ejemplo en una pared interna o externa de la cámara o cavidad. La expresión "fuerza centrífuga relativa" o FCR se entiende generalmente como la fuerza efectiva impartida sobre un objeto o sustancia (tal como una célula, muestra, o gránulo y/o un punto de la cámara u otro recipiente que se hace girar), respecto a la fuerza gravitatoria de la Tierra, en un punto concreto del espacio con respecto al eje de rotación. El valor puede determinarse mediante fórmulas conocidas, teniendo en cuenta la fuerza gravitatoria, la velocidad de rotación y el radio de rotación (distancia entre el eje de rotación y el objeto, sustancia o partícula en donde se mide la FCR). En algunos casos, al menos una parte del contacto, incubación y/o modificación genética de las células, p. ej., de una composición estimulada de linfocitos T CD4+ enriquecidos o linfocitos T CD8+ enriquecidos, con el virus se realiza con una rotación de entre aproximadamente 100 g y 3200 g, 1000 g y 2000 g, 1000 g y 3200 g, 500 g y 1000 g, 400 g y 1200 g, 600 g y 800 g, 600 y 700 g, o 500 g y 700 g. En algunos casos, la rotación se sitúa entre 600 g y 700 g, p. ej., a o aproximadamente 693 g.

En determinados casos, al menos una parte de la modificación genética, transducción, y/o transfección se realiza con

- rotación, p. ej., espinoculación y/o centrifugación. En algunos casos, la rotación se realiza durante, durante aproximadamente, o durante al menos o aproximadamente 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, o durante al menos 7 días. En algunos casos, la rotación se realiza durante o durante aproximadamente 60 minutos. En determinados casos, la rotación se realiza durante aproximadamente 30 minutos. En algunos casos, la rotación se realiza durante aproximadamente 30 minutos a entre 600 g y 700 g, p. ej., a o aproximadamente 693 g.
- En determinados casos, el número de células viables que van a ser modificadas genéticamente, transducidas y/o transfectadas varía de aproximadamente  $5 \times 10^6$  células a aproximadamente  $100 \times 10^7$  células, tal como de aproximadamente  $10 \times 10^6$  células a aproximadamente  $100 \times 10^6$  células, de aproximadamente  $100 \times 10^6$  células a aproximadamente  $200 \times 10^6$  células, de aproximadamente  $200 \times 10^6$  células a aproximadamente  $300 \times 10^6$  células, de aproximadamente  $300 \times 10^6$  células a aproximadamente  $400 \times 10^6$  células, de aproximadamente  $400 \times 10^6$  células a aproximadamente  $500 \times 10^6$  células, o de aproximadamente  $500 \times 10^6$  células a aproximadamente  $100 \times 10^7$  células. En ejemplos particulares, el número de células viables que van a ser modificadas genéticamente, transducidas, y/o transfectadas es de aproximadamente o menos de aproximadamente  $300 \times 10^6$  células.
- En determinados casos, al menos una parte de la modificación genética, transducción y/o transfección se lleva a cabo en un volumen (p. ej., el volumen de espinoculación) de aproximadamente 5 ml a aproximadamente 100 ml, tal como de aproximadamente 10 ml a aproximadamente 50 ml, de aproximadamente 15 ml a aproximadamente 45 ml, de aproximadamente 20 ml a aproximadamente 40 ml, de aproximadamente 25 ml a aproximadamente 35 ml, o de o aproximadamente 30 ml. En determinados casos, el volumen del sedimento celular tras la espinoculación varía de aproximadamente 1 ml a aproximadamente 25 ml, tal como de aproximadamente 5 ml a aproximadamente 20 ml, de aproximadamente 5 ml a aproximadamente 15 ml, de aproximadamente 5 ml a aproximadamente 10 ml, o de o aproximadamente 10 ml.
- En algunos casos, la transferencia de genes se logra estimulando primero la célula, tal como mediante combinación con un estímulo que induce una respuesta tal como la proliferación, la supervivencia y/o la activación, p. ej., tal como se mide por la expresión de una citocina o un marcador de activación, seguido de la transducción de las células activadas y la expansión en cultivo hasta cantidades suficientes para aplicaciones clínicas. En determinados casos, la transferencia de genes se realiza incubando primero las células en condiciones de estimulación, tal como por cualquiera de los métodos descritos en la Sección I-B.
- En algunos casos, los métodos de modificación genética se llevan a cabo poniendo en contacto una o más células de una composición con una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína recombinante, p. ej., receptor recombinante. En algunos casos, el contacto puede efectuarse mediante centrifugación, tal como espinoculación (p. ej., inoculación centrífuga). Dichos métodos incluyen cualquiera de los descritos en la publicación internacional número WO2016/073602. Algunos ejemplos de cámaras centrífugas incluyen las producidas y vendidas por Biosafe SA, incluidas las que se utilizan con el sistema Sepax® y Sepax® 2, incluidas las cámaras centrífugas A-200/F y A-200 y diversos kits para su uso con dichos sistemas. Ejemplos de cámaras, sistemas e instrumentos de procesamiento y armarios se describen, por ejemplo, en la Patente US-6.123.655, Patente US-6.733.433 y Solicitud de Patente de Estados Unidos publicada, N.º de publicación: US 2008/0171951, y solicitud de patente internacional publicada, publicación N.º WO 00/38762. Algunos ejemplos de kits para usar con estos sistemas son, pero no se limitan a, kits de un solo uso vendidos por BioSafe SA con el nombre de producto CS-430.1, CS-490.1, CS-600.1 o CS-900.2.
- En algunos casos, el sistema está incluido con y/o asociado con otros instrumentos, incluidos los instrumentos para operar, automatizar, controlar y/o monitorizar los casos de la etapa de transducción y una o más etapas de procesamiento realizadas en el sistema, p. ej., una o más etapas de procesamiento que pueden llevarse a cabo con o con relación al sistema de cámara centrífuga descrito en el presente documento o en la publicación internacional número WO2016/073602. En algunos casos, estos instrumentos están contenidos dentro de un armario. En algunos casos, los instrumentos incluyen un armario, que incluye una carcasa que contiene circuitos de control, una centrífuga, una cubierta, motores, bombas, sensores, pantallas y una interfaz de usuario. En la Patente US-6.123.655, Patente US-6.733.433 y el documento US 2008/0171951 se describe un dispositivo ilustrativo.
- En algunos casos, el sistema comprende una serie de recipientes, p. ej., bolsas, tubos, llaves de paso, abrazaderas, conectores, y una cámara de centrifugado. En algunos casos, los recipientes, tales como bolsas, incluyen uno o más recipientes, tales como bolsas, que contienen las células que se van a transducir y las partículas de vector vírico, en el mismo recipiente o en recipientes separados, tal como la misma bolsa o bolsas separadas. En algunos casos, el sistema incluye además uno o más recipientes, tales como bolsas, que contienen medio, tal como diluyente y/o solución de lavado, que se introduce en la cámara y/o en otros componentes para diluir, resuspender y/o lavar los componentes y/o composiciones durante los métodos. Los recipientes pueden conectarse en una o más posiciones del sistema, tal como en una posición correspondiente a una línea de entrada, línea de diluyente, línea de lavado, línea de residuos y/o línea de salida.
- En algunos casos, la cámara está asociada a una centrífuga, capaz de efectuar la rotación de la cámara, tal como alrededor de su eje de rotación. La rotación puede producirse antes, durante y/o después de la incubación con relación

a la transducción de las células y/o en una o más de las otras etapas de procesamiento. Por lo tanto, en algunos casos, una o más de las distintas etapas de procesamiento se lleva a cabo por rotación, p. ej., a una fuerza determinada. Por lo general, la cámara puede girar en sentido vertical o generalmente vertical, de tal manera que la cámara se asiente verticalmente durante la centrifugación y la pared lateral y el eje sean verticales o generalmente verticales, con la(s) pared(es) extrema(s) horizontal(es) o generalmente horizontal(es).

En algunos casos, la composición que contiene células y la composición que contiene partículas de vector vírico, y opcionalmente aire, pueden combinarse o mezclarse antes de suministrar las composiciones a la cavidad. En algunos casos, la composición que contiene células y la composición que contiene partículas de vector vírico, y opcionalmente aire, se suministran por separado y se combinan y mezclan en la cavidad. En algunos casos, una composición que contiene células, una composición que contiene partículas de vector vírico y, opcionalmente, aire, pueden suministrarse a la cavidad interna en cualquier orden. En cualquiera de algunos de dichos casos, una composición que contiene células y partículas de vector vírico es la composición de entrada una vez combinadas o mezcladas, si se combinan o mezclan dentro o fuera de la cámara centrífuga y/o si las células y las partículas de vector vírico se suministran a la cámara centrífuga juntas o por separado, tal como simultánea o secuencialmente.

En algunos casos, la introducción de un volumen de gas, tal como aire, se produce antes de la incubación de las células y las partículas de vector vírico, tales como la rotación, en el método de transducción. En algunos casos, la introducción del volumen de gas, tal como aire, se produce durante la incubación de las células y las partículas de vector vírico, tales como la rotación, en el método de transducción.

En algunos casos, el volumen líquido de las células o partículas de vector vírico que componen la composición de transducción, y opcionalmente el volumen de aire, puede ser un volumen predeterminado. El volumen puede ser un volumen programado y/o controlado por circuitos asociados al sistema.

En algunos casos, la introducción de la composición transductora, y opcionalmente gas, tal como aire, se controla manualmente, de forma semiautomática y/o automática hasta que se haya introducido un volumen deseado o predeterminado en la cavidad interna de la cámara. En algunos casos, un sensor asociado al sistema puede detectar líquido y/o gas que fluye hacia y desde la cámara centrífuga, tal como mediante su color, caudal y/o densidad, y puede comunicarse con los circuitos asociados para detener o continuar la introducción según sea necesario hasta que se haya alcanzado la introducción de dicho volumen deseado o predeterminado. En algunos casos, un sensor programado o capaz únicamente de detectar líquido en el sistema, pero no gas (p. ej., aire), puede hacerse capaz de permitir el paso del gas, tal como aire, en el sistema sin detener la introducción. En algunos de dichos casos, si se desea, se puede colocar un trozo de tubo no transparente en la línea, cerca del sensor, durante la introducción de gas, tal como aire. En algunos casos, la introducción de gas, tal como aire, puede controlarse manualmente.

En casos de los métodos divulgados, la cavidad interna de la cámara centrífuga se somete a una rotación de alta velocidad. En algunos casos, la rotación se efectúa antes de, simultáneamente, posteriormente o de forma intermitente con la introducción de la composición líquida de entrada, y opcionalmente aire. En algunos casos, la rotación se efectúa tras la introducción de la composición líquida de entrada y, opcionalmente, de aire. En algunos casos, la rotación es por centrifugación de la cámara centrífuga a una fuerza centrífuga relativa en la superficie interna de la pared lateral de la cavidad interna y/o en una capa superficial de las células de o aproximadamente o al menos de o aproximadamente 800 g, 1000 g, 1100 g, 1500 g, 1600 g, 1800 g, 2000 g, 2200 g, 2500 g, 3000 g, 3500 g o 4000 g. En algunos casos, la rotación es por centrifugación a una fuerza que es superior a o aproximadamente 1100 g, tal como superior a o aproximadamente 1200 g, superior a o aproximadamente 1400 g, superior a o aproximadamente 1600 g, superior a o aproximadamente 1800 g, superior a o aproximadamente 2000 g, superior a o aproximadamente 2400 g, superior a o aproximadamente 2800 g, superior a o aproximadamente 3000 g o superior a o aproximadamente 3200 g. En algunos casos, la rotación es por centrifugación a una fuerza que es o es aproximadamente 1600 g.

En algunos casos, el método de transducción incluye rotación o centrifugación de la composición de transducción, y opcionalmente aire, en la cámara centrífuga durante un tiempo superior a o aproximadamente 5 minutos, tal como superior a o aproximadamente 10 minutos, superior a o aproximadamente 15 minutos, superior a o aproximadamente 20 minutos, superior a o aproximadamente 30 minutos, superior a o aproximadamente 45 minutos, superior a o aproximadamente 60 minutos, superior a o aproximadamente 90 minutos o superior a o aproximadamente 120 minutos. En algunos casos, la composición de transducción, y opcionalmente aire, se hace girar o centrifugar en la cámara centrífuga durante un tiempo superior a 5 minutos, pero no más de 60 minutos, no más de 45 minutos, no más de 30 minutos o no más de 15 minutos. En casos particulares, la transducción incluye rotación o centrifugación durante o aproximadamente 60 minutos.

En algunos casos, el método de transducción incluye rotación o centrifugación de la composición de transducción, y opcionalmente aire, en la cámara centrífuga durante un tiempo comprendido entre o aproximadamente entre 10 minutos y 60 minutos, 15 minutos y 60 minutos, 15 minutos y 45 minutos, 30 minutos y 60 minutos o 45 minutos y 60 minutos, cada uno inclusive, y a una fuerza en la superficie interna de la pared lateral de la cavidad interna y/o en una capa superficial de las células de al menos o superior a o aproximadamente 1000 g, 1100 g, 1200 g, 1400 g, 1500 g, 1600 g, 1800 g, 2000 g, 2200 g, 2400 g, 2800 g, 3200 g o 3600 g. En casos particulares, el método de transducción incluye la rotación o centrifugación de la composición de transducción, p. ej., las células y las partículas de vector

vírico, a o aproximadamente 1600 g durante 60 minutos.

En algunos casos, el gas, tal como aire, de la cavidad de la cámara se expulsa de la cámara. En algunos casos, el gas, tal como aire, se expulsa a un recipiente que está unido operativamente como parte del sistema cerrado con la cámara centrífuga. En algunos casos, el recipiente es un recipiente libre o vacío. En algunos casos, el aire, tal como gas, de la cavidad de la cámara se expulsa a través de un filtro que está operativamente conectado a la cavidad interna de la cámara a través de una línea de tubería estéril. En algunos casos, el aire se expulsa usando procesos manuales, semiautomáticos o automáticos. En algunos casos, el aire se expulsa de la cámara antes de, simultáneamente, intermitente o posteriormente a la expresión de la composición de salida que contiene las células incubadas y las partículas de vector vírico, tal como células en las que se ha iniciado la transducción o células que han sido transducidas con un vector vírico, de la cavidad de la cámara.

En algunos casos, la transducción y/u otra incubación se realiza como o como parte de un proceso continuo o semicontinuo. En algunos casos, un proceso continuo implica la introducción continua de las células y las partículas de vector vírico, p. ej., la composición de transducción (ya sea como una única composición preexistente o introduciendo continuamente en el mismo recipiente, p. ej., cavidad, y por tanto mezclando, sus partes), y/o la expresión o expulsión continua de líquido, y opcionalmente expulsión de gas (p. ej., aire), del recipiente, durante al menos una parte de la incubación, p. ej., mientras se centrifuga. En algunos casos, la introducción continua y la expresión continua se realizan, al menos en parte, simultáneamente. En algunos casos, la introducción continua se produce durante parte de la incubación, p. ej., durante una parte de la centrifugación, y la expresión continua se produce durante una parte separada de la incubación. Ambas pueden alternarse. Por lo tanto, la introducción y la expresión continuas, mientras se está llevando a cabo la incubación, puede permitir procesar un mayor volumen total de muestra, p. ej., que se transduzca.

En algunos casos, la incubación forma parte de un proceso continuo, incluyendo el método, durante al menos una parte de la incubación, realizar la introducción continua de dicha composición de transducción en la cavidad durante la rotación de la cámara y durante una parte de la incubación, realizar la expresión continua de líquido y, opcionalmente, expulsar el gas (p. ej., aire), de la cavidad a través de la al menos una abertura durante la rotación de la cámara.

En algunos casos, la incubación semicontinua se lleva a cabo alternando entre la introducción de la composición en la cavidad, incubación, expresión de líquido de la cavidad y, opcionalmente, expulsión del gas (p. ej., aire) de la cavidad, tal como a un recipiente de salida, y luego la introducción de una composición posterior (p. ej., segunda, tercera, etc.) que contiene más células y otros reactivos para su procesamiento, p. ej., partículas de vector vírico, y repetición del proceso. Por ejemplo, en algunos casos, la incubación forma parte de un proceso semicontinuo, incluyendo el método, antes de la incubación, realizar la introducción de la composición de transducción en la cavidad a través de dicha al menos una abertura, y posteriormente a la incubación, realizar la expresión del líquido de la cavidad; realizar la introducción de otra composición de transducción que comprende células y las partículas de vector vírico en dicha cavidad interna; e incubar la otra composición de transducción en dicha cavidad interna en condiciones por las que dichas células en dicha otra composición de transducción se transducen con dicho vector. El proceso puede continuar de forma iterativa durante varias rondas adicionales. En este sentido, los métodos semicontinuos o continuos pueden permitir la producción de un volumen y/o número de células aún mayor.

En algunos casos, una parte de la incubación de transducción se realiza en la cámara centrífuga, que se realiza en condiciones que incluyen rotación o centrifugación.

En algunos casos, el método incluye una incubación en la que otra parte de la incubación de las células y las partículas de vector vírico se lleva a cabo sin rotación ni centrifugación, lo que generalmente se lleva a cabo después de al menos una parte de la incubación que incluye la rotación o centrifugación de la cámara. En determinados casos, la incubación de las células y las partículas de vector vírico se lleva a cabo sin rotación ni centrifugación durante al menos 1 hora, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 32 horas, 48 horas, 60 horas, 72 horas, 90 horas, 96 horas, 3 días, 4 días, 5 días o más de 5 días. En determinados casos, la incubación se lleva a cabo durante o aproximadamente 72 horas.

En algunos de dichos casos, la incubación adicional se efectúa en condiciones que den lugar a la integración del vector vírico en un genoma hospedador de una o más de las células. Está al alcance de un experto evaluar o determinar si la incubación ha dado lugar a la integración de partículas de vector vírico en un genoma hospedador y, por tanto, determinar empíricamente las condiciones para una incubación posterior. En algunos casos, la integración de un vector vírico en un genoma hospedador puede evaluarse midiendo el nivel de expresión de una proteína recombinante, tal como una proteína heteróloga, codificada por un ácido nucleico contenido en el genoma de la partícula de vector vírico tras la incubación. Pueden utilizarse varios métodos bien conocidos para evaluar el nivel de expresión de moléculas recombinantes, tales como la detección mediante métodos basados en afinidad, p. ej., métodos basados en inmunoafinidad, p. ej., en el contexto de las proteínas de superficie celular, tal como mediante citometría de flujo. En algunos ejemplos, la expresión se mide mediante la detección de un marcador de transducción y/o un construcción indicadora. En algunos casos, el ácido nucleico que codifica una proteína de superficie truncada se incluye dentro del vector y se utiliza como marcador de expresión y/o potenciador de la misma.

- En algunos casos, la composición que contiene células, el vector, p. ej., partículas víricas, y el reactivo puede rotarse, generalmente a una fuerza o velocidad relativamente bajas, tal como una velocidad inferior a la utilizada para granular las células, tal como de 600 rpm a 1700 rpm o de aproximadamente 600 rpm a aproximadamente 1700 rpm (p. ej., a o aproximadamente o al menos 600 rpm, 1000 rpm, o 1500 rpm o 1700 rpm). En algunos casos, la rotación se lleva a una fuerza, p. ej., una fuerza centrífuga relativa, de 100 g a 3200 g o de aproximadamente 100 g a aproximadamente 3200 g (p. ej., a o aproximadamente 100 g, 200 g, 300 g, 400 g, 500 g, 1000 g, 1500 g, 2000 g, 2500 g, 3000 g o 3200 g), medida, por ejemplo, en una pared interna o externa de la cámara o cavidad. La expresión "fuerza centrífuga relativa" o FCR se entiende generalmente como la fuerza efectiva impartida sobre un objeto o sustancia (tal como una célula, muestra, o gránulo y/o un punto de la cámara u otro recipiente que se hace girar), respecto a la fuerza gravitatoria de la Tierra, en un punto concreto del espacio con respecto al eje de rotación. El valor puede determinarse mediante fórmulas conocidas, teniendo en cuenta la fuerza gravitatoria, la velocidad de rotación y el radio de rotación (distancia entre el eje de rotación y el objeto, sustancia o partícula en donde se mide la FCR).
- En algunos casos, durante al menos una parte de la modificación genética, por ejemplo, transducción, y/o posteriormente a la modificación genética, las células se transfieren al conjunto de bolsas de biorreactor para el cultivo de las células modificadas genéticamente, tal como para el cultivo o la expansión de las células, como se ha descrito anteriormente.
- En determinados casos, una composición de linfocitos T enriquecidos son modificados genéticamente, p. ej., transducidos o transfectados, en presencia de un adyuvante de la transducción. En algunos casos, se modifica genéticamente una composición de linfocitos T enriquecidos en presencia de uno o más policlones. En algunos casos, una composición de linfocitos T enriquecidos se transduce, p. ej., se incuba con una partícula de vector vírico, en presencia de uno o más adyuvantes de la transducción. En casos particulares, una composición de linfocitos T enriquecidos se transfecta, p. ej., se incuba con un vector no vírico, en presencia de uno o más adyuvantes de la transducción. En determinados casos, la presencia de uno o más adyuvantes de la transducción aumenta la eficacia de la administración de genes, tal como aumentando la cantidad, porción, y/o porcentaje de células de la composición que se han modificado genéticamente (p. ej., transducidas o transfectadas). En determinados casos, la presencia de uno o más adyuvantes de la transducción aumenta la eficacia de la transfección. En determinados casos, la presencia de uno o más adyuvantes de la transducción aumenta la eficacia de la transducción. En casos particulares, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 % al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, o al menos un 99 % de las células modificadas genéticamente en presencia de un policlón contienen o expresan el polinucleótido recombinante. En algunos casos, al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 100 %, al menos un 150 %, al menos 1 vez, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, o al menos 100 veces más células de una composición son modificadas genéticamente para contener o expresar los adyuvantes de la transducción recombinantes en presencia de un policlón, en comparación con un método alternativo y/o ilustrativo de modificación genética sin la presencia de un adyuvante de la transducción.
- En algunos casos, la composición de células enriquecidas se modifica genéticamente en presencia de menos de 100 µg/ml, menos de 90 µg/ml, menos de 80 µg/ml, menos de 75 µg/ml, menos de 70 µg/ml, menos de 60 µg/ml, menos de 50 µg/ml, menos de 40 µg/ml, menos de 30 µg/ml, menos de 25 µg/ml, menos de 20 µg/ml, o menos de µg/ml, menos de 10 µg/ml de un adyuvante de la transducción. En determinados casos, los adyuvantes de la transducción adecuados para su uso con los métodos divulgados incluyen, pero no se limitan a policlones, fibronectina o fragmentos o variantes derivados de la fibronectina, RetroNectin, y combinaciones de los mismos.
- En algunos casos, las células se modifican genéticamente en presencia de una citocina, p. ej., una citocina humana recombinante, a una concentración de entre 1 UI/ml y 1.000 UI/ml, entre 10 UI/ml y 50 UI/ml, entre 50 UI/ml y 100 UI/ml, entre 100 UI/ml y 200 UI/ml, entre 100 UI/ml y 500 UI/ml, entre 250 UI/ml y 500 UI/ml, o entre 500 UI/ml y 1.000 UI/ml.
- En algunos casos, una composición de linfocitos T enriquecidos se modifica genéticamente en presencia de IL-2, p. ej., IL-2 humana recombinante, a una concentración comprendida entre 1 UI/ml y 200 UI/ml, entre 10 UI/ml y 100 UI/ml, entre 50 UI/ml y 150 UI/ml, entre 80 UI/ml y 120 UI/ml, entre 60 UI/ml y 90 UI/ml, o entre 70 UI/ml y 90 UI/ml. En casos particulares, la composición de linfocitos T enriquecidos se modifica genéticamente en presencia de IL-2 recombinante a una concentración de o de aproximadamente 50 UI/ml, 55 UI/ml, 60 UI/ml, 65 UI/ml, 70 UI/ml, 75 UI/ml, 80 UI/ml, 85 UI/ml, 90 UI/ml, 95 UI/ml, 100 UI/ml, 110 UI/ml, 120 UI/ml, 130 UI/ml, 140 UI/ml o 150 UI/ml. En algunos casos, la composición de linfocitos T enriquecidos se modifica genéticamente en presencia de o de aproximadamente 85 UI/ml. En algunos casos, la población de linfocitos T es una población de linfocitos T CD4+. En casos particulares, la composición de linfocitos T enriquecidos está enriquecida en linfocitos T CD4+, donde no se enriquece en linfocitos T CD8+ y/o donde los linfocitos T CD8+ se seleccionan negativamente o se agotan en la composición. En casos particulares, la composición de linfocitos T enriquecidos es una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos. En casos particulares, la composición de linfocitos T enriquecidos está enriquecida en linfocitos T CD8+, donde no se enriquece en linfocitos T CD4+ y/o donde los linfocitos T CD4+ se seleccionan negativamente o se agotan en la composición.



- En algunos casos, una composición de linfocitos T enriquecidos se modifica genéticamente en presencia de IL-7 recombinante, p. ej., IL-7 humana recombinante, a una concentración comprendida entre 100 UI/ml y 2.000 UI/ml, entre 500 UI/ml y 1.000 UI/ml, entre 100 UI/ml y 500 UI/ml, entre 500 UI/ml y 750 UI/ml, entre 750 UI/ml y 1.000 UI/ml, o entre 550 UI/ml y 650 UI/ml. En casos particulares, la composición de linfocitos T enriquecidos se modifica genéticamente en presencia de IL-7 a una concentración de o de aproximadamente 50 UI/ml, 100 UI/ml, 150 UI/ml, 200 UI/ml, 250 UI/ml, 300 UI/ml, 350 UI/ml, 400 UI/ml, 450 UI/ml, 500 UI/ml, 550 UI/ml, 600 UI/ml, 650 UI/ml, 700 UI/ml, 750 UI/ml, 800 UI/ml, 750 UI/ml, 750 UI/ml, 750 UI/ml o 1.000 UI/ml. En casos particulares, la composición de linfocitos T enriquecidos se modifica genéticamente en presencia de o de aproximadamente 600 UI/ml de IL-7. En algunos casos, la composición modificada genéticamente en presencia de IL-7 recombinante está enriquecida en una población de linfocitos T, p. ej., linfocitos T CD4+. En casos particulares, la composición de linfocitos T enriquecidos está enriquecida en linfocitos T CD4+, donde no se enriquece en linfocitos T CD8+ y/o donde los linfocitos T CD8+ se seleccionan negativamente o se agotan en la composición.
- En algunos casos, una composición de linfocitos T enriquecidos se modifica genéticamente en presencia de IL-15 recombinante, p. ej., IL-15 humana recombinante, a una concentración comprendida entre 0,1 UI/ml y 100 UI/ml, entre 1 UI/ml y 50 UI/ml, entre 5 UI/ml y 25 UI/ml, entre 25 UI/ml y 50 UI/ml, entre 5 UI/ml y 15 UI/ml, o entre 10 UI/ml y 100 UI/ml. En casos particulares, la composición de linfocitos T enriquecidos se modifica genéticamente en presencia de IL-15 a una concentración de o de aproximadamente 1 UI/ml, 2 UI/ml, 3 UI/ml, 4 UI/ml, 5 UI/ml, 6 UI/ml, 7 UI/ml, 8 UI/ml, 9 UI/ml, 10 UI/ml, 11 UI/ml, 12 UI/ml, 13 UI/ml, 14 UI/ml, 15 UI/ml, 20 UI/ml, 25 UI/ml, 30 UI/ml, 40 UI/ml o 50 UI/ml. En algunos casos, la composición de linfocitos T enriquecidos está modificada genéticamente con o con aproximadamente 10 UI/ml de IL-15. En algunos casos, la composición de linfocitos T enriquecidos se incubaba en o en aproximadamente 10 UI/ml de IL-15 recombinante. En algunos casos, la composición modificada genéticamente en presencia de IL-15 recombinante está enriquecida en una población de linfocitos T, p. ej., linfocitos T CD4+ y/o linfocitos T CD8+. En algunos casos, la composición de linfocitos T enriquecidos es una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos. En casos particulares, la composición de linfocitos T enriquecidos está enriquecida en linfocitos T CD8+, donde no se enriquece en linfocitos T CD4+ y/o donde los linfocitos T CD4+ se seleccionan negativamente o se agotan en la composición. En algunos casos, la composición de linfocitos T enriquecidos es una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos. En casos particulares, la composición de linfocitos T enriquecidos está enriquecida en linfocitos T CD4+, donde no se enriquece en linfocitos T CD8+ y/o donde los linfocitos T CD8+ se seleccionan negativamente o se agotan en la composición.
- En casos particulares, una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos se modifica genéticamente en presencia de IL-2 y/o IL-15. En determinados casos, una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos se modifica genéticamente en presencia de IL-2, IL-7 y/o IL-15. En algunos casos, la IL-2, la IL-7 y/o la IL-15 son recombinantes. En determinados casos, la IL-2, la IL-7 y/o la IL-15 son humanas. En casos particulares, la una o más citocinas son o incluyen IL-2, IL-7 y/o IL-15 recombinante humana.
- En casos particulares, las células se modifican genéticamente en presencia de uno o más antioxidantes. En algunos casos, los antioxidantes incluyen, pero no se limitan a, uno o más antioxidantes que comprenden un tocoferol, un tocotrienol, alfa-tocoferol, beta-tocoferol, gamma-tocoferol, delta-tocoferol, alfa-tocotrienol, beta-tocotrienol, alfa-tocoferolquinona, Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), flavonoides, una isoflavona, licopeno, beta-caroteno, selenio, ubiquinona, luteína, S-adenosilmetionina, glutatión, taurina, N-acetilcisteína (NAC), ácido cítrico, L-carnitina, HTB, monoglicérol, ácido ascórbico, galato de propilo, metionina, cisteína, homocisteína, glutatión, cistamina y cistationina, y/o glicina-glicina-histidina.
- En algunos casos, el uno o más antioxidantes es o incluye un oxidante que contiene azufre. En determinados casos, un antioxidante que contenga azufre puede incluir antioxidantes que contengan tiol y/o antioxidantes que presenten una o más fracciones de azufre, p. ej., dentro de una estructura anular. En algunos casos, los antioxidantes que contienen azufre pueden incluir, por ejemplo, N-acetilcisteína (NAC) y 2,3- dimercaptopropanol (DMP), L-2-oxo-4-tiazolidinocarboxilato (OTC) y ácido lipoico. En casos particulares, el antioxidante que contiene azufre es un precursor del glutatión. En algunos casos, el precursor del glutatión es una molécula que puede modificarse en una o más etapas dentro de una célula para obtener glutatión. En casos particulares, un precursor del glutatión puede incluir, pero sin limitarse a N-acetil cisteína (NAC), ácido L-2-oxotiazolidin-4-carboxílico (procisteína), ácido lipoico, S-alil cisteína, o cloruro de metilmetionina sulfonio.
- En algunos casos, las células se modifican genéticamente en presencia de uno o más antioxidantes. En algunos casos, las células se modifican genéticamente en presencia de entre 1 ng/ml y 100 ng/ml, entre 10 ng/ml y 1 µg/ml, entre 100 ng/ml y 10 µg/ml, entre 1 µg/ml y 100 µg/ml, entre 10 µg/ml y 1 mg/ml, entre 100 µg/ml y 1 mg/ml, entre 1 500 µg/ml y 2 mg/ml, 500 µg/ml y 5 mg/ml, entre 1 mg/ml y 10 mg/ml, o entre 1 mg/ml y 100 mg/ml de uno o más antioxidantes. En algunos casos, las células se modifican genéticamente en presencia de o de aproximadamente 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml, 0,2 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,8 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml, 200 mg/ml, 300 mg/ml, 400 mg/ml, 500 mg/ml del uno o más antioxidantes. En algunos casos, el uno o más antioxidantes es o incluye un antioxidante que contiene azufre. En casos particulares, el uno o más antioxidantes es o incluye un precursor del

glutación.

En algunos casos, las células se modifican genéticamente en presencia de NAC. En algunos casos, las células se modifican genéticamente en presencia de entre 1 ng/ml y 100 ng/ml, entre 10 ng/ml y 1 µg/ml, entre 100 ng/ml y 10 µg/ml, entre 1 µg/ml y 100 µg/ml, entre 10 µg/ml y 1 mg/ml, entre 100 µg/ml y 1 mg/ml, entre 1.500 µg/ml y 2 mg/ml, 500 µg/ml y 5 mg/ml, entre 1 mg/ml y 10 mg/ml, o entre 1 mg/ml y 100 mg/ml de NAC. En algunos casos, las células se modifican genéticamente en presencia de o de aproximadamente 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml, 0,2 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,8 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml, 200 mg/ml, 300 mg/ml, 400 mg/ml, 500 mg/ml de NAC. En algunos casos, las células se modifican genéticamente con o con aproximadamente 0,8 mg/ml.

En algunos casos, una composición de linfocitos T enriquecidos, tal como linfocitos T estimulados, p. ej., linfocitos T CD4+ estimulados o linfocitos T CD8+ estimulados, se modifica genéticamente en presencia de uno o más policones. En algunos casos, una composición de linfocitos T enriquecidos, tal como linfocitos T estimulados, p. ej., linfocitos T CD4+ estimulados o linfocitos T CD8+ estimulados, se transduce, p. ej., se incuba con una partícula de vector vírico, en presencia de uno o más policones. En casos particulares, una composición de linfocitos T enriquecidos, tal como linfocitos T estimulados, p. ej., linfocitos T CD4+ estimulados o linfocitos T CD8+ estimulados, se transfecta, p. ej., se incuba con un vector no vírico, en presencia de uno o más policones. En determinados casos, la presencia de uno o más policones aumenta la eficacia de la administración de genes, tal como aumentando la cantidad, porción, y/o porcentaje de células de la composición que se han modificado genéticamente (p. ej., transducidas o transfectadas). En determinados casos, la presencia de uno o más policones aumenta la eficacia de la transducción. En casos particulares, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, o al menos un 99 % de las células modificadas genéticamente en presencia de un policones contienen o expresan el polinucleótido recombinante. En algunos casos, al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 100 %, al menos un 150 %, al menos 1 vez, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, o al menos 100 veces más células de una composición son modificadas genéticamente para contener o expresar el polinucleótido recombinante en presencia de un policones, en comparación con un método alternativo y/o ilustrativo de modificación genética de células sin la presencia de un policones.

En determinados casos, la composición de células enriquecidas, p. ej., la composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos o linfocitos T CD8+ enriquecidos, tales como linfocitos T estimulados de los mismos, en presencia de una baja concentración o cantidad de un policones, p. ej., respecto a un método ilustrativo y/o alternativo de modificación genética de células en presencia de un policones. En determinados casos, la composición de células enriquecidas, tal como linfocitos T estimulados, p. ej., linfocitos T CD4+ estimulados o linfocitos T CD8+ estimulados, se modifica genéticamente en presencia de menos del 90 %, menos del 80 %, menos del 75 %, menos del 70 %, menos del 60 %, menos del 50 %, menos del 40 %, menos del 30 %, menos del 25 %, menos del 20 %, menos del 10 %, menos del 5 %, menos del 1 %, menos del 0,1 %, de menos del 0,01 % de la cantidad y/o concentración del policones de un proceso ilustrativo y/o alternativo de modificación genética de células. En algunos casos, la composición de células enriquecidas, tal como linfocitos T estimulados, p. ej., linfocitos T CD4+ estimulados o linfocitos T CD8+ estimulados, se modifica genéticamente en presencia de menos de 100 µg/ml, menos de 90 µg/ml, menos de 80 µg/ml, menos de 75 µg/ml, menos de 70 µg/ml, menos de 60 µg/ml, menos de 50 µg/ml, menos de 40 µg/ml, menos de 30 µg/ml, menos de 25 µg/ml, menos de 20 µg/ml, o menos de µg/ml, menos de 10 µg/ml del policones. En casos particulares, la composición de células enriquecidas, tal como linfocitos T estimulados, p. ej., linfocitos T CD4+ estimulados o linfocitos T CD8+ estimulados, se modifica genéticamente en presencia de o de aproximadamente 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml, 20 µg/ml, 25 µg/ml, 30 µg/ml, 35 µg/ml, 40 µg/ml, 45 µg/ml o 50 µg/ml, del policones.

En casos particulares, la modificación genética de la composición de células enriquecidas, tal como linfocitos T estimulados, p. ej., linfocitos T CD4+ estimulados o linfocitos T CD8+ estimulados, en presencia de un policones reduce la cantidad de muerte celular, p. ej., por necrosis, muerte celular programada, o apoptosis. En algunos casos, la composición de linfocitos T enriquecidos, tal como linfocitos T estimulados, p. ej., linfocitos T CD4+ estimulados o linfocitos T CD8+ estimulados, se modifica genéticamente en presencia de una pequeña cantidad de un policones, p. ej., menos de 100 µg/ml, 50 µg/ml, o 10 µg/ml, y al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 %, o al menos un 99,9 % de las células sobreviven, p. ej., no experimentan necrosis, muerte celular programada, o apoptosis, durante o al menos 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, o más de 7 días después de que se haya completado la etapa de modificación genética. En algunos casos, la composición se modifica genéticamente en presencia de una baja concentración o cantidad de policones en comparación con el método alternativo y/o ilustrativo de modificación genética de células en presencia de una mayor cantidad o concentración de policones, p. ej., más de 50 µg/ml, 100 µg/ml, 500 µg/ml, o 1.000 µg/ml, y las células de la composición tienen al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 100 %, al menos un 150 %, al menos 1 vez, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, o al menos

100 veces mayor supervivencia en comparación con las células sometidas al proceso ilustrativo y/o alternativo.

En algunos casos, el polícatión está cargado positivamente. En determinados casos, el polícatión reduce las fuerzas de repulsión entre las células y los vectores, p. ej., vectores víricos o no víricos, y media el contacto y/o la unión del vector a la superficie celular. En algunos casos, el polícatión es polibreno, DEAE-dextrano, sulfato de protamina, poli-L-lisina, o liposomas catiónicos.

En casos particulares, el polícatión es sulfato de protamina. En algunos casos, la composición de linfocitos T enriquecidos, tal como linfocitos T estimulados, p. ej., linfocitos T CD4+ estimulados o linfocitos T CD8+ estimulados, se modifican genéticamente en presencia de menos o aproximadamente 500 µg/ml, menos de o aproximadamente 400 µg/ml, menos de o aproximadamente 300 µg/ml, menos de o aproximadamente 200 µg/ml, menos de o aproximadamente 150 µg/ml, menos de o aproximadamente 100 µg/ml, menos de o aproximadamente 90 µg/ml, menos de o aproximadamente 80 µg/ml, menos de o aproximadamente 75 µg/ml, menos de o aproximadamente 70 µg/ml, menos de o aproximadamente 60 µg/ml, menos de o aproximadamente 50 µg/ml, menos de o aproximadamente 40 µg/ml, menos de o aproximadamente 30 µg/ml, menos de o aproximadamente 25 µg/ml, menos de o aproximadamente 20 µg/ml, o menos de o aproximadamente 15 µg/ml, o menos de o aproximadamente 10 µg/ml de sulfato de protamina. En casos particulares, la composición de células enriquecidas, tal como linfocitos T estimulados, p. ej., linfocitos T CD4+ estimulados o linfocitos T CD8+ estimulados, se modifica genéticamente en presencia de o de aproximadamente 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml, 20 µg/ml, 25 µg/ml, 30 µg/ml, 35 µg/ml, 40 µg/ml, 45 µg/ml, 50 µg/ml, 55 µg/ml, 60 µg/ml, 75 µg/ml, 80 µg/ml, 85 µg/ml, 90 µg/ml, 95 µg/ml, 100 µg/ml, 105 µg/ml, 110 µg/ml, 115 µg/ml, 120 µg/ml, 125 µg/ml, 130 µg/ml, 135 µg/ml, 140 µg/ml, 145 µg/ml, o 150 µg/ml de sulfato de protamina.

En algunos casos, la composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos modificados genéticamente, tal como linfocitos T estimulados, por ejemplo, linfocitos T CD4+ estimulados, incluye al menos un 40 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 %, al menos un 99,9 %, o un o aproximadamente un 100 % de linfocitos T CD4+. En determinados casos, la composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos, tal como linfocitos T estimulados, por ejemplo, linfocitos T CD4+ estimulados, que han sido modificados genéticamente incluye menos del 40 %, menos del 35 %, menos del 30 %, menos del 25 %, menos del 20 %, menos del 15 %, menos del 10 %, menos del 5 %, menos del 1 %, menos del 0,1 %, o menos del 0,01 % de linfocitos T CD8+, y/o no contiene linfocitos T CD8+, y/o está exenta o sustancialmente exenta de linfocitos T CD8+.

En algunos casos, la composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos, tal como linfocitos T estimulados, por ejemplo, linfocitos T CD8+ estimulados, que se ha modificado genéticamente incluye al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 %, al menos un 99,9 %, o un o aproximadamente un 100 % de linfocitos T CD8+. En determinados casos, la composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos, tal como linfocitos T estimulados, por ejemplo, linfocitos T CD8+ estimulados, que han sido modificados genéticamente incluye menos del 40 %, menos del 35 %, menos del 30 %, menos del 25 %, menos del 20 %, menos del 15 %, menos del 10 %, menos del 5 %, menos del 1 %, menos del 0,1 %, o menos del 0,01 % de linfocitos T CD4+, y/o no contiene linfocitos T CD4+, y/o está exenta o sustancialmente exenta de linfocitos T CD4+.

En algunos casos, la modificación genética de las células incluye un cultivo, contacto o incubación con el vector, p. ej., el vector vírico o el vector no vírico. En determinados casos, la modificación genética incluye el cultivo, contacto, y/o incubación de las células con el vector y se realiza durante, durante aproximadamente o durante al menos 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 30 horas, 36 horas, 40 horas, 48 horas, 54 horas, 60 horas, 72 horas, 84 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, o 7 días, o más de 7 días. En casos particulares, la modificación genética incluye el cultivo, contacto, y/o incubación de las células con el vector durante o durante aproximadamente 24 horas, 36 horas, 48 horas, 60 horas, 72 horas, u 84 horas, o durante o durante aproximadamente 2 días, 3 días, 4 días o 5 días. En algunos casos, la etapa de modificación genética se realiza durante o durante aproximadamente 24 horas, 36 horas, 48 horas, 60 horas, 72 horas u 84 horas. En determinados casos, la modificación genética se realiza durante aproximadamente 60 horas o aproximadamente 84 horas, durante o durante aproximadamente 72 horas, o durante o durante aproximadamente 2 días.

En algunos casos, la modificación genética se realiza a una temperatura de aproximadamente 25 a aproximadamente 38 °C, tal como de aproximadamente 30 a aproximadamente 37 °C, de aproximadamente 36 a aproximadamente 38 °C, o a o aproximadamente a 37 °C ± 2 °C. En algunos casos, la composición de linfocitos T enriquecidos se modifica genéticamente a un nivel de CO<sub>2</sub> de aproximadamente 2,5 % a aproximadamente 7,5 %, tal como de aproximadamente 4 % a aproximadamente 6 %, por ejemplo a o aproximadamente 5 % ± 0,5 %. En algunos casos, la composición de linfocitos T enriquecidos se modifica genéticamente a una temperatura de aproximadamente de 37 °C y/o a un nivel de CO<sub>2</sub> de o aproximadamente del 5 %.

En algunos casos, las células, p. ej., los linfocitos T CD4+ y/o CD8+, se cultivan, después de realizar una o más etapas de modificación genética, p. ej., transducción o transfección de las células para que contengan un polinucleótido que codifique un receptor recombinante. En algunos casos, el cultivo puede incluir el cultivo, incubación, estimulación, activación, expansión y/o propagación. En algunos de dichos casos, el cultivo adicional se efectúa en condiciones que

den lugar a la integración del vector vírico en un genoma hospedador de una o más de las células. La incubación y/o la modificación genética se pueden llevar a cabo en un recipiente de cultivo, tal como una unidad, cámara, pocillo, columna, tubo, conjunto de tubos, válvula, vial, placa de cultivo, bolsa u otro recipiente para el cultivo o cultivar células. En algunos casos, las composiciones o células se incuban en presencia de condiciones de estimulación o un agente

5 estimulador. Tales condiciones incluyen las diseñadas para inducir la proliferación, expansión, activación y/o supervivencia de células en la población, para imitar la exposición al antígeno y/o para cebar las células para la modificación genética, tal como para la introducción de un receptor de antígeno recombinante.

10 En algunos casos, la incubación posterior se lleva a cabo a temperaturas superiores a la temperatura ambiente, tal como superiores a o superiores a aproximadamente 25 °C, tal como generalmente superiores a o superiores a aproximadamente 32 °C, 35 °C o 37 °C. En algunos casos, la incubación posterior se efectúa a una temperatura de o aproximadamente de 37 °C  $\pm$  2 °C, tal como a una temperatura de o aproximadamente de 37 °C.

15 En algunos casos, la incubación posterior se realiza en condiciones de estimulación y/o activación de las células, condiciones que pueden incluir uno o más de medios particulares, temperatura, contenido de oxígeno, contenido de dióxido de carbono, tiempo, agentes, p. ej., nutrientes, aminoácidos, antibióticos, iones y/o factores estimulantes, tales como citocinas, quimiocinas, antígenos, compañeros de unión, proteínas de fusión, receptores solubles recombinantes y cualquier otro agente diseñado para activar las células.

20 En algunos casos, las condiciones o agentes estimuladores incluyen uno o más agentes (p. ej., agentes estimuladores y/o complementarios), p. ej., ligando, que es capaz de activar un dominio de señalización intracelular de un complejo TCR. En algunos casos, el agente activa o inicia la cascada de señalización intracelular de TCR/CD3 en un linfocito T, tal como agentes adecuados para emitir una señal primaria, p. ej., para iniciar la activación de una señal inducida por ITAM, tal como las específicas de un componente del TCR, y/o un agente que promueve una señal coestimuladora,

25 tal como uno específico de un receptor coestimulador de linfocitos T, p. ej., anti CD3, anti-CD28, o anti-41-BB, por ejemplo, opcionalmente unido a un soporte sólido tal como una perla, y/o una o más citocinas. Entre los agentes estimuladores se encuentran las perlas anti-CD3/anti-CD28 (p. ej., DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T Cell Expander, y/o las perlas ExpACT®). Opcionalmente, el método de expansión puede comprender además la etapa de añadir anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28 al medio de cultivo. En algunos casos, los agentes estimuladores incluyen IL-2 y/o

30 IL-15, por ejemplo, una concentración de IL-2 de al menos aproximadamente 10 unidades/ml.

En algunos casos, las condiciones o agentes estimuladores incluyen uno o más agentes, p. ej., ligando, que es capaz de activar un dominio de señalización intracelular de un complejo TCR. En algunos casos, el agente activa o inicia la cascada de señalización intracelular de TCR/CD3 en un linfocito T. Dichos agentes pueden incluir anticuerpos, tales

35 como los específicos para un componente de TCR y/o receptor coestimulador, p. ej., anti CD3, anti CD28, por ejemplo, unido a un soporte sólido tal como una perla, y/o una o más citocinas. Opcionalmente, el método de expansión puede comprender además la etapa de añadir anticuerpo anti-CD3 y/o anti CD28 al medio de cultivo (p. ej., a una concentración de al menos aproximadamente 0,5 ng/ml). En algunos casos, los agentes estimuladores incluyen IL-2 y/o IL-15, por ejemplo, una concentración de IL-2 de al menos aproximadamente 10 unidades/ml, al menos

40 aproximadamente 50 unidades/ml, al menos aproximadamente 100 unidades/ml o al menos aproximadamente 200 unidades/ml.

Las condiciones pueden incluir uno o más de medios particulares, temperatura, contenido de oxígeno, contenido de dióxido de carbono, tiempo, agentes, p. ej., nutrientes, aminoácidos, antibióticos, iones y/o factores estimulantes, tales

45 como citocinas, quimiocinas, antígenos, compañeros de unión, proteínas de fusión, receptores solubles recombinantes y cualquier otro agente diseñado para activar las células.

En algunos casos, la incubación se lleva a cabo de acuerdo con técnicas tales como las descritas en la patente de EE.UU. N.º 6.040.1 77 de Riddell. *et al.*, Klebanoff *et al.* (2012) J Immunother. 35(9): 651-660, Terakura *et al.* (2012) Blood. 1:72-82, y/o Wang *et al.* (2012) J Immunother. 35(9):689-701.

50

En algunos casos, la incubación posterior se lleva a cabo en el mismo recipiente o aparato en donde se produjo el contacto. En algunos casos, la incubación posterior se lleva a cabo sin rotación ni centrifugación, que generalmente se lleva a cabo después de al menos una parte de la incubación en rotación, p. ej., con relación a la centrifugación o la espinoculación. En algunos casos, la incubación posterior se lleva a cabo fuera de una fase estacionaria, tal como

55 fuera de una matriz cromatográfica, por ejemplo, en solución.

En algunos casos, la incubación posterior se lleva a cabo en un recipiente o aparato distinto de aquel en el que se produjo el contacto, tal como por transferencia, p. ej., transferencia automática, de la composición de células en un

60 recipiente o aparato diferente tras el contacto con las partículas víricas y el reactivo.

En algunos casos, el cultivo o incubación adicionales, p. ej., para facilitar la expansión *ex vivo*, se lleva a cabo durante más de o más de aproximadamente 24 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días o 14 días. En algunos casos, el cultivo o incubación adicionales se lleva a cabo durante no más

65 de 6 días, no más de 5 días, no más de 4 días, no más de 3 días, no más de 2 días o no más de 24 horas.

En algunos casos, la duración total de la incubación, p. ej., con el agente estimulador, está comprendida entre 1 hora y 96 horas, 1 hora y 72 horas, 1 hora y 48 horas, 4 horas y 36 horas, 8 horas y 30 horas o 12 horas y 24 horas, tal como al menos o aproximadamente al menos o aproximadamente 6 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas o 72 horas. En algunos casos, la incubación adicional se realiza durante un tiempo comprendido entre 1 hora y 48 horas, 4 horas y 36 horas, 8 horas y 30 horas o 12 horas y 24 horas, ambos inclusive.

En algunos casos, los métodos divulgados en el presente documento no incluyen el cultivo ni la incubación adicionales, p. ej., no incluyen la etapa de expansión *ex vivo*, ni incluyen una etapa de expansión *ex vivo* sustancialmente más corta.

En algunos casos, el reactivo estimulador se elimina y/o se separa de las células antes de la modificación genética. En casos particulares, el reactivo estimulador se elimina y/o se separa de las células después de la modificación genética. En determinados casos, el agente estimulador se elimina y/o se separa de las células después de la modificación genética y antes del cultivo de las células modificadas genéticamente, p. ej., en condiciones que promueven la proliferación y/o expansión. En determinados casos, el reactivo estimulador es un reactivo estimulador que se describe en la Sección I-B-1. En casos particulares, el reactivo estimulador se elimina y/o se separa de las células como se describe en la Sección I-B-2.

### 1. Vectores y métodos

También se divulgan uno o más polinucleótidos (p. ej., moléculas de ácido nucleico) que codifican receptores recombinantes, vectores para modificar genéticamente células que expresen dichos receptores de acuerdo con los métodos divulgados para producir las células modificadas genéticamente. En algunos casos, el vector contiene el ácido nucleico que codifica el receptor recombinante. En casos particulares, el vector es un vector vírico o un vector no vírico. En algunos casos, el vector es un vector vírico, tal como un vector retrovírico, p. ej., un vector lentivírico o un vector gammaretrovírico.

En algunos casos, la secuencia de ácido nucleico que codifica el receptor recombinante, p. ej., el receptor de antígeno quimérico (CAR) contiene una secuencia señal que codifica un péptido señal. Ejemplos ilustrativos no limitantes de péptidos señal incluyen, por ejemplo, el péptido señal de la cadena alfa del GMCSFR establecido en la SEQ ID NO: 61 y codificado por la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO: 60, el péptido señal de CD8 alfa establecido en la SEQ ID NO: 59, o el péptido señal de CD33 establecido en la SEQ ID NO: 58.

En algunos casos, los vectores incluyen vectores víricos, p. ej., retrovíricos o lentivíricos, vectores no víricos o transposones, p. ej., el sistema de transposón *Bella Durmiente*, vectores obtenidos del virus del simio 40 (SV40), adenovirus, el virus adenoasociado (AAV, por sus siglas en inglés), vectores lentivíricos o vectores retrovíricos, tales como los vectores gammaretrovíricos, el vector retrovírico obtenido del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV), el virus del sarcoma mieloproliferativo (MPSV), el virus de células madre embrionarias murinas (MESV), el virus de células madre murinas (MSCV), el virus formador de focos del bazo (SFFV) o el virus adenoasociado (AAV).

En algunos casos, el vector vírico o el ADN no vírico contiene un ácido nucleico que codifica una proteína recombinante heteróloga. En algunos casos, la molécula recombinante heteróloga es o incluye un receptor recombinante, p. ej., un receptor de antígeno, SB-transposones, p. ej., para el silenciamiento de genes, transposones encerrados en cápside, ácido nucleico homólogo de doble cadena, p. ej., para la recombinación genómica de los genes indicadores (p. ej., proteínas fluorescentes, tales como la GFP) o luciferasa).

#### a. Partículas de vector vírico

En algunos casos, los ácidos nucleicos recombinantes se transfieren a las células usando partículas víricas infecciosas recombinantes, tal como, p. ej., vectores obtenidos del virus del simio 40 (SV40), adenovirus, virus adenoasociado (AAV). En algunos casos, los ácidos nucleicos recombinantes se transfieren a los linfocitos T usando vectores lentivíricos o vectores retrovíricos recombinantes, tales como vectores gamma-retrovíricos (véase, p. ej., Koste *et al.* (2014) *Gene Therapy* 2014 Apr 3. doi: 10.1038/gt.2014.25; Carlens *et al.* (2000) *Exp Hematol* 28(10): 1137-46; Alonso-Camino *et al.* (2013) *Mol Ther Nucl Acids* 2, e93; Park *et al.*, *Trends Biotechnol.* 29 de noviembre de 2011 (11): 550-557.

En algunos casos, el vector retrovírico tiene una secuencia de repetición terminal larga (LTR), p. ej., un vector retrovírico obtenido del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV), el virus del sarcoma mieloproliferativo (MPSV), el virus de células madre embrionarias murinas (MESV), el virus de células madre murinas (MSCV), el virus formador de focos del bazo (SFFV) o el virus adenoasociado (AAV). La mayoría de los vectores retrovíricos se obtienen de retrovirus murinos. En algunos casos, los retrovirus incluyen los derivados de cualquier fuente de células de aves o mamíferos. Los retrovirus normalmente son anfitrópicos, lo que significa que son capaces de infectar células hospedadoras de varias especies, incluyendo seres humanos. En un caso, el gen que ha de expresarse reemplaza las secuencias gag, pol y/o env retrovíricas. Se han descrito varios sistemas retrovíricos ilustrativos (p. ej., las Patentes de los EE. UU. N.º 5.219.740; 6.207.453; 5.219.740; Miller y Rosman (1989) *BioTechniques* 7:980-990; Miller, A. D. (1990) *Human Gene Therapy* 1:5-14; Scarpa *et al.* (1991) *Virology* 180:849-852; Burns *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad.*

Sci. USA 90:8033-8037; y Boris-Lawrie and Temin (1993) Cur. Opin. Genet. Develop. 3:102-109.

Se conocen métodos de transducción lentivírica. Se describen métodos de ejemplo en, p. ej., Wang *et al.* (2012) J. Immunother. 35(9): 689-701; Cooper *et al.* (2003) Blood. 101:1637-1644; Verhoeven *et al.* (2009) Methods Mol Biol. 506: 97-114; y Cavalieri *et al.* (2003) Blood. 102(2): 497-505.

En algunos casos, las partículas de vector vírico contienen un genoma derivado de un vector basado en el genoma retrovítico, tal como los derivados de un vector basado en el genoma lentivítico. En algunos casos de los vectores víricos divulgados, el ácido nucleico heterólogo que codifica un receptor recombinante, tal como un receptor de antígeno, tal como un CAR, está contenido y/o localizado entre las secuencias 5' LTR y 3' LTR del genoma del vector.

En algunos casos, el genoma del vector vírico es el genoma de un lentivirus, tal como el genoma del VIH-1 o el genoma del SIV. Por ejemplo, se han generado vectores lentivíricos atenuando de forma múltiple los genes de virulencia, por ejemplo, los genes env, vif, vpr y nef se pueden eliminar, haciendo que el vector sea más seguro para fines terapéuticos. Se conocen vectores lentivíricos. Véase Naldini *et al.*, (1996 y 1998); Zufferey *et al.*, (1997); Dull *et al.*, 1998, las patentes de Estados Unidos N.º 6.013.516; y 5.994.136). En algunos casos, los vectores víricos están basados en plásmidos o en virus, y están configurados para transportar las secuencias esenciales para incorporar ácido nucleico foráneo, para la selección y para la transferencia del ácido nucleico a una célula hospedadora. Los lentivirus conocidos pueden obtenerse fácilmente de depósitos o colecciones tales como la American Type Culture Collection ("ATCC"); 10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209), o aislarse de fuentes conocidas mediante técnicas comúnmente disponibles.

Ejemplos no limitantes de vectores lentivíricos incluyen los derivados de un lentivirus, tal como el virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1), VIH-2, un virus de inmunodeficiencia de simios (VIS), virus linfotrópico T humano 1 (HTLV-1), HTLV-2 o virus de la anemia infecciosa equina (E1AV). Por ejemplo, se han generado vectores lentivíricos atenuando de forma múltiple los genes de virulencia del VIH, por ejemplo, los genes env, vif, vpr, vpu y nef se eliminan, haciendo que el vector sea más seguro para fines terapéuticos. Los vectores lentivíricos son conocidos en la técnica, véase Naldini *et al.*, (1996 y 1998); Zufferey *et al.*, (1997); Dull *et al.*, 1998, las patentes de Estados Unidos N.º 6.013.516; y 5.994.136). En algunos casos, los vectores víricos están basados en plásmidos o en virus, y están configurados para transportar las secuencias esenciales para incorporar ácido nucleico foráneo, para la selección y para la transferencia del ácido nucleico a una célula hospedadora. Los lentivirus conocidos pueden obtenerse fácilmente de depósitos o colecciones tales como la American Type Culture Collection ("ATCC"); 10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209), o aislarse de fuentes conocidas mediante técnicas comúnmente disponibles.

En algunos casos, el vector del genoma vírico puede contener secuencias de las LTR 5' y 3' de un retrovirus, tal como un lentivirus. En algunos casos, la construcción del genoma vírico puede contener secuencias de las LTR 5' y 3' de un lentivirus, y en particular puede contener las secuencias R y U5 de la LTR 5' de un lentivirus y una LTR 3' inactivada o autoinactivadora de un lentivirus. Las secuencias LTR pueden ser secuencias LTR de cualquier lentivirus de cualquier especie. Por ejemplo, pueden ser secuencias LTR del VIH, VIS, FIV o BIV. Normalmente, las secuencias LTR son secuencias LTR del VIH.

En algunos casos, el ácido nucleico de un vector vírico, tal como un vector vírico del VIH, carece de unidades transcripcionales adicionales. El genoma del vector puede contener una LTR 3' inactivada o autoactivadora (Zufferey *et al.* J Virol 72: 9873, 1998; Miyoshi *et al.*, J Virol 72:8150, 1998;). Por ejemplo, la delección en la región U3 de la LTR 3' del ácido nucleico utilizado para producir el ARN del vector vírico puede utilizarse para generar vectores autoinactivadores (SIN). Esta delección puede transferirse a continuación a la LTR 5' del ADN provírico durante la transcripción inversa. Un vector autoinactivador generalmente tiene una delección de las secuencias potenciadoras y promotoras de la repetición terminal larga (LTR, por sus siglas en inglés) de 3', que se copia en la LTR 5' durante la integración de vectores. En algunos casos puede eliminarse una secuencia suficiente, incluyendo la eliminación de una caja TATA, para abolir la actividad transcripcional de la LTR. Esto puede impedir la producción de ARN vectorial de longitud completa en las células transducidas. En algunos casos, el elemento U3 de la LTR 3' contiene una delección de su secuencia potenciadora, la caja TATA, Sp1 y sitios NF-kappa B. Como resultado de la autoinactivación de la LTR 3', el provirus que se genera después de la entrada y la transcripción inversa contiene una LTR 5' inactivada. Esto puede mejorar la seguridad al reducir el riesgo de movilización del genoma del vector y la influencia de la LTR en los promotores celulares cercanos. La LTR 3' autoinactivadora se puede construir por cualquier método conocido en la técnica. En algunos casos, esto no afecta a los títulos del vector ni a las propiedades *in vitro* o *in vivo* del vector.

Opcionalmente, la secuencia U3 de la LTR 5' lentivírica se puede reemplazar con una secuencia promotora en la construcción vírica, tal como una secuencia promotora heteróloga. Esto puede aumentar el título de virus recuperado de la línea celular de empaquetamiento. También se puede incluir una secuencia potenciadora. Se puede usar cualquier combinación de potenciador/promotor que aumente la expresión del genoma de ARN vírico en la línea celular de empaquetamiento. En un ejemplo, se utiliza la secuencia potenciadora/promotora del CMV (Patente US-5.385.839 y Patente US- 5.168.062).

En determinados casos, el riesgo de mutagénesis insercional puede minimizarse construyendo el genoma del vector retrovítico, tal como el genoma del vector lentivítico, para que sea una integración defectuosa. Se puede seguir una

- variedad de enfoques para producir un genoma del vector no integrante. En algunos casos, se puede(n) introducir una(s) mutación(es) en el componente de la enzima integrasa del gen pol, de tal manera que codifique una proteína con una integrasa inactiva. En algunos casos, el propio genoma del vector puede modificarse para evitar la integración, por ejemplo, mutando o delecionando uno o ambos sitios de unión, o haciendo que la LTR 3'-tracto de polipurina proximal (PPT) no sea funcional mediante deleción o modificación. En algunos casos, hay disponible enfoques no genéticos; éstos incluyen agentes farmacológicos que inhiben una o más funciones de la integrasa. Los enfoques no son mutuamente excluyentes; es decir, se puede usar más de uno a la vez. Por ejemplo, tanto la integrasa como los sitios de unión pueden no ser funcionales, o la integrasa y el sitio PPT pueden no ser funcionales, o los sitios de unión y el sitio de PPT pueden no ser funcionales, o todos ellos pueden no ser funcionales. Tales métodos y genomas de vectores víricos son conocidos y están disponibles (véase Philpott y Thrasher, *Human Gene Therapy* 18:483, 2007; Engelman *et al.* *J Virol* 69:2729, 1995; Brown *et al.* *J Virol* 73:9011 (1999); documento WO 2009/076524; McWilliams *et al.*, *J Virol* 77:11150, 2003; Powell y Levin *J Virol* 70:5288, 1996).
- En algunos casos, el vector contiene secuencias para su propagación en una célula hospedadora, tal como una célula hospedadora procariota. En algunos casos, el ácido nucleico del vector vírico contiene uno o más orígenes de replicación para la propagación en una célula procariota, tal como una célula bacteriana. En algunos casos, los vectores que incluyen un origen de replicación procariota también pueden contener un gen cuya expresión confiere un marcador detectable o seleccionable tal como una resistencia a fármacos.
- El genoma del vector vírico se construye normalmente en forma de plásmido que puede transfectarse en una línea celular de empaquetamiento o productora. Se puede utilizar cualquiera de los diversos métodos conocidos para producir partículas retrovíricas cuyo genoma contenga una copia de ARN del genoma del vector vírico. En algunos casos, al menos dos componentes intervienen en la fabricación de un sistema de administración de genes basado en virus: en primer lugar, plásmidos de empaquetamiento, que engloba las proteínas estructurales, así como las enzimas necesarias para generar una partícula de vector vírico, y segundo, el propio vector vírico, es decir, el material genético que se va a transferir. En el diseño de uno de estos componentes o de ambos pueden introducirse medidas de bioseguridad.
- En algunos casos, el plásmido de empaquetamiento puede contener todas las proteínas retrovíricas, tal como HIV-1, proteínas distintas de las proteínas de la envoltura (Naldini *et al.*, 1998). En otros casos, los vectores víricos pueden carecer de genes víricos adicionales, tales como los que están asociadas a la virulencia, p. ej., vpr, vif, vpu y nef, y/o Tat, un transactivador primario del VIH. En algunos casos, los vectores lentivíricos, tales como los vectores lentivíricos basados en el VIH, comprenden solo tres genes del virus parental: gag, pol y rev, lo que reduce o elimina la posibilidad de reconstitución de un virus de tipo silvestre mediante recombinación.
- En algunos casos, el genoma del vector vírico se introduce en una línea celular de empaquetamiento que contiene todos los componentes necesarios para empaquetar el ARN genómico del virus, transcrito del genoma del vector vírico, en partículas víricas. De manera alternativa, el genoma del vector vírico puede comprender uno o más genes que codifican componentes víricos además de las una o más secuencias, p. ej., ácidos nucleicos recombinantes, de interés. En algunos casos, para evitar la replicación del genoma en la célula diana, sin embargo, los genes víricos endógenos necesarios para la replicación se eliminan y se proporcionan por separado en la línea celular de empaquetamiento.
- En algunos casos, se transfecta una línea celular de empaquetamiento con uno o más vectores plasmídicos que contienen los componentes necesarios para generar las partículas. En algunos casos, se transfecta una línea celular de empaquetamiento con un plásmido que contiene el genoma del vector vírico, incluidas las LTR, la secuencia de empaquetamiento de acción en cis y la secuencia de interés, es decir, un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno, tal como un CAR; y uno o más plásmidos colaboradores que codifican los componentes enzimáticos y/o estructurales del virus, tales como gag, pol y/o rev. En algunos casos, se utilizan múltiples vectores para separar los diversos componentes genéticos que generan las partículas de vector retrovírico. En algunos de dichos casos, la provisión de vectores separados a la célula de empaquetamiento reduce la posibilidad de que se produzcan acontecimientos de recombinación que, de otro modo, podrían generar virus competentes para la replicación. En algunos casos, se puede usar un solo vector plasmídico que tiene todos los componentes retrovíricos.
- En algunos casos, la partícula de vector retrovírico, tal como una partícula de vector lentivírico, está pseudotipada para aumentar la eficacia de transducción de las células hospedadoras. Por ejemplo, una partícula de vector retrovírico, tal como una partícula de vector lentivírico, en algunos casos está pseudotipada con una glicoproteína VSV-G, que proporciona una amplia variedad de hospedadores celulares que amplía los tipos de células que pueden transducirse. En algunos casos, se transfecta una línea celular de empaquetamiento con un plásmido o polinucleótido que codifica una glicoproteína de envoltura no nativa, tales como para incluir envolturas xenotrópicas, politrópicas o anfotrópicas, tales como la envoltura del virus Sindbis, GALV o VSV-G.
- En algunos casos, la línea celular de empaquetamiento proporciona los componentes, incluyendo proteínas reguladoras y estructurales víricas, que se requieren en trans para el empaquetamiento del ARN genómico vírico en partículas de vector lentivírico. En algunos casos, la línea celular de empaquetamiento puede ser cualquier línea celular que sea capaz de expresar proteínas lentivíricas y producir partículas de vector lentivírico funcionales. En

algunos casos, las líneas celulares de empaquetamiento adecuadas incluyen células 293 (ATCC CCL X), 293T, HeLa (ATCC CCL 2), D17 (ATCC CCL 183), MDCK (ATCC CCL 34), BHK (ATCC CCL-10) y Cf2Th (ATCC CRL 1430).

En algunos casos, la línea celular de empaquetamiento expresa de forma estable la(s) proteína(s) vírica(s). Por ejemplo, en algunos casos, una línea celular de empaquetamiento que contiene los genes gag, pol, rev y/u otros genes estructurales pero sin los componentes LTR y de empaquetamiento. En algunos casos, una línea celular de empaquetamiento puede transfectarse transitoriamente con moléculas de ácido nucleico que codifican una o más proteínas víricas con relación al genoma del vector vírico que contiene una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína heteróloga, y/o un ácido nucleico que codifica una glicoproteína de envoltura.

En algunos casos, los vectores víricos y los plásmidos de empaquetamiento y/o colaboradores se introducen mediante transfección o infección en la línea celular de empaquetamiento. La línea celular de empaquetamiento produce partículas víricas que contienen el genoma del vector vírico. Los métodos de transfección o infección son bien conocidos. Ejemplos no limitantes incluyen fosfato de calcio, DEAE-dextrano y métodos de lipofección, electroporación y microinyección.

Cuando un plásmido recombinante y las secuencias LTR y de empaquetamiento retrovíricas se introducen en una línea celular especial (p. ej., mediante precipitación con fosfato cálcico, por ejemplo), las secuencia de empaquetado pueden permitir que el transcrito de ARN del plásmido recombinante se empaquete en partículas víricas, que luego pueden ser secretadas en los medios de cultivo. A continuación, en algunos casos se recogen los medios que contienen los retrovirus recombinantes, se concentran opcionalmente y se usan para transferencia génica. Por ejemplo, en algunos casos, después de la cotransfección de los plásmidos de empaquetamiento y el vector de transferencia a la línea celular de empaquetamiento, las partículas de vector vírico se recuperan de los medios de cultivo y se titula mediante métodos convencionales usados por los expertos en la materia.

En algunos casos, un vector retrovírico, tal como un vector lentivírico, puede producirse en una línea celular de empaquetamiento, tal como una línea celular HEK 293T ilustrativa, mediante la introducción de plásmidos para permitir la generación de partículas lentivíricas. En algunos casos, se transfecta una célula de empaquetamiento y/o contiene un polinucleótido que codifica gag y pol, y un polinucleótido que codifica un receptor recombinante, tal como un receptor de antígeno, por ejemplo, un CAR. En algunos casos, la línea celular de empaquetamiento se transfecta opcional y/o adicionalmente con y/o contiene un polinucleótido que codifica una proteína rev. En algunos casos, la línea celular de empaquetamiento se transfecta opcional y/o adicionalmente con y/o contiene un polinucleótido que codifica una glicoproteína de envoltura no nativa, tal como VSV-G. En algunos casos, aproximadamente dos días después de la transfección de las células, p. ej., células HEK 293T, el sobrenadante celular contiene vectores lentivíricos recombinantes, que pueden recuperarse y titularse.

Las partículas de vectores retrovíricos recuperadas y/o producidas pueden utilizarse para transducir células diana utilizando los métodos descritos. Una vez en las células diana, el ARN vírico se transcribe inversamente, se importa al núcleo y se integra de forma estable en el genoma del hospedador. Uno o dos días después de la integración del ARN vírico, la expresión de la proteína recombinante, p. ej., receptor de antígeno, tal como CAR, puede detectarse.

En algunos casos, los métodos divulgados implican métodos de transducción de células por contacto, p. ej., incubando una composición de células que comprende una pluralidad de células con una partícula vírica. En algunos casos, las células a transfectar o transducir son o comprenden células primarias obtenidas de un sujeto, tales como células enriquecidas y/o seleccionadas de un sujeto.

En algunos casos, la concentración de células a transducir de la composición es de  $1,0 \times 10^5$  células/ml a  $1,0 \times 10^8$  células/ml o de aproximadamente  $1,0 \times 10^5$  células/ml a aproximadamente  $1,0 \times 10^8$  células/ml, tal como al menos o aproximadamente al menos  $1,0 \times 10^5$  células/ml,  $5 \times 10^5$  células/ml,  $1 \times 10^6$  células/ml,  $5 \times 10^6$  células/ml,  $1 \times 10^7$  células/ml,  $5 \times 10^7$  células/ml o  $1 \times 10^8$  células/ml.

En algunos casos, las partículas víricas se suministran en una determinada proporción de copias de las partículas de vector vírico o de unidades infecciosas (UI) de las mismas, por número total de células a transducir (UI/célula). Por ejemplo, en algunos casos, las partículas víricas están presentes durante el contacto en o aproximadamente en o al menos en o aproximadamente en 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, o 60 UI de las partículas de vector vírico por una de las células.

En algunos casos, el título de las partículas de vector vírico está entre o entre aproximadamente  $1 \times 10^6$  UI/ml y  $1 \times 10^8$  UI/ml, tal como entre o entre aproximadamente  $5 \times 10^6$  UI/ml y  $5 \times 10^7$  UI/ml, tal como al menos  $6 \times 10^6$  UI/ml,  $7 \times 10^6$  UI/ml,  $8 \times 10^6$  UI/ml,  $9 \times 10^6$  UI/ml,  $1 \times 10^7$  UI/ml,  $2 \times 10^7$  UI/ml,  $3 \times 10^7$  UI/ml,  $4 \times 10^7$  UI/ml, o  $5 \times 10^7$  UI/ml.

En algunos casos, la transducción se puede lograr con una multiplicidad de infección (MOI) de menos de 100, tal como generalmente menos de 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5 o menos.

En algunos casos, el método implica poner en contacto o incubar, las células con las partículas víricas. En algunos casos, el contacto es de 30 minutos a 72 horas, tal como de 30 minutos a 48 horas, de 30 minutos a 24 horas o de



1 hora a 24 horas, tal como al menos o aproximadamente al menos 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 36 horas o más.

En algunos casos, el contacto se realiza en solución. En algunos casos, las células y las partículas víricas se ponen en contacto en un volumen de 0,5 ml a 500 ml o de aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 500 ml, tal como de o aproximadamente de 0,5 ml a 200 ml, de 0,5 ml a 100 ml, de 0,5 ml a 50 ml, de 0,5 ml a 10 ml, de 0,5 ml a 5 ml, de 5 ml a 500 ml, de 5 ml a 200 ml, de 5 ml a 100 ml, de 5 ml a 50 ml, de 5 ml a 10 ml, de 10 ml a 500 ml, de 10 ml a 200 ml, de 10 ml a 100 ml, de 10 ml a 50 ml, de 50 ml a 500 ml, de 50 ml a 200 ml, de 50 ml a 100 ml, de 100 ml a 500 ml, de 100 ml a 200 ml o de 200 ml a 500 ml.

En determinados casos, las células de entrada se tratan, incuban o se ponen en contacto con partículas que comprenden moléculas de unión que se unen o reconocen el receptor recombinante codificado por el ADN vírico.

En algunos casos, la incubación de las células con las partículas de vector vírico da como resultado o produce una composición de salida que comprende células transducidas con las partículas de vector vírico.

#### b. Vectores no víricos

En algunos casos, los ácidos nucleicos recombinantes se transfieren a los linfocitos T a través de electroporación (véase, p. ej., Chicaybam *et al.* (2013) PLoS ONE 8(3): e60298 y Van Tedeloo *et al.* (2000) Gene Therapy 7(16): 1431-1437). En algunos casos, los ácidos nucleicos recombinantes se transfieren a los linfocitos T a través de transposición (véase, p. ej., Manuri *et al.* (2010) Hum Gene Ther 21(4): 427-437; Sharma *et al.* (2013) Molec Ther Nucl Acids 2, e74; y Huang *et al.* (2009) Methods Mol Biol 506: 115-126). Otros métodos de introducción y expresión de material genético en células inmunitarias incluyen la transfección con fosfato de calcio (p. ej., como se describe en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y.), fusión de protoplastos, transfección mediada por liposomas catiónicos; bombardeo de micropartículas facilitado por partículas de tungsteno (Johnston, Nature, 346: 776-777 (1990)); y coprecipitación de ADN con fosfato de estroncio (Brash *et al.*, Mol. Cell Biol., 7: 2031-2034 (1987)).

Otros enfoques y vectores para la transferencia de los ácidos nucleicos que codifican los productos recombinantes son los descritos, p. ej., en la solicitud de patente internacional, N.º de publicación: WO2014055668 y la Patente US-7.446.190.

En algunos casos, los ácidos nucleicos recombinantes se transfieren a los linfocitos T mediante transposones. Los transposones (elementos transponibles), son segmentos móviles de ADN que pueden desplazarse de un locus a otro dentro de los genomas. Estos elementos se mueven a través de un mecanismo de "cortar y pegar" conservador: la transposasa cataliza la escisión del transposón de su ubicación original y promueve su reintegración en otro lugar del genoma. Los elementos deficientes en transposasa pueden movilizarse si la transposasa la proporciona otro gen de transposasa. Por lo tanto, los transposones pueden utilizarse para incorporar un ADN extraño a un genoma hospedador sin necesidad de utilizar un sistema de transducción vírico. Ejemplos de transposones adecuados para su uso con células de mamífero, p. ej., leucocitos primarios humanos, incluyen, pero sin limitación, Bella Durmiente y PiggyBac.

La transfección basada en transposones es un sistema de dos componentes formado por una transposasa y un transposón. En algunos casos, el sistema comprende un transposón diseñado para incluir un ADN extraño (también denominado en el presente documento ADN de carga), p. ej., un gen que codifica un receptor recombinante, que está flanqueado por secuencias de repetición invertida/repetición directa (IR/DR) que son reconocidas por una transposasa acompañante. En algunos casos, un plásmido no vírico codifica una transposasa bajo el control de un promotor. La transfección del plásmido en una célula hospedadora da lugar a una expresión transitoria de la transposasa, por lo tanto, durante un periodo inicial tras la transfección, la transposasa se expresa a niveles suficientes para integrar el transposón en el ADN genómico. En algunos casos, la propia transposasa no se integra en el ADN genómico, por lo que la expresión de la transposasa disminuye con el tiempo. En algunos casos, la expresión de la transposasa es expresada por la célula hospedadora a niveles suficientes para integrar un transposón correspondiente durante menos de aproximadamente 4 horas, menos de aproximadamente 8 horas, menos de aproximadamente 12 horas, menos de aproximadamente 24 horas, menos de aproximadamente 2 días, menos de aproximadamente 3 días, menos de aproximadamente 4 días, menos de aproximadamente 5 días, menos de aproximadamente 6 días, menos de aproximadamente 7 días, menos de aproximadamente 2 semanas, menos de aproximadamente 3 semanas, menos de aproximadamente 4 semanas, menos de aproximadamente 8 semanas. En algunos casos, el ADN de carga que se introduce en el genoma del hospedador no se elimina posteriormente del genoma del hospedador, al menos porque el hospedador no expresa una transposasa endógena capaz de escindir el ADN de carga.

Bella Durmiente (SB) es un miembro sintético de la superfamilia de transposones Tc/1-mariner, reconstruido a partir de elementos latentes albergados en el genoma de peces salmónidos. La transfección basada en transposones SB es un sistema de dos componentes formado por una transposasa y un transposón que contiene secuencias de repetición invertida/repetición directa (IR/DR) que dan lugar a una integración precisa en un dinucleótido TA. El transposón está diseñado con un casete de expresión de interés flanqueado por IR/DR. La transposasa SB se une a

sitios de unión específicos que se encuentran en la IR del transposón Bella Durmiente. La transposasa SB media en la integración del transposón, un elemento móvil que codifica una secuencia de carga flanqueada a ambos lados por repeticiones terminales invertidas que albergan sitios de unión para la enzima catalítica (SB). La expresión estable resulta cuando SB inserta secuencias génicas en cromosomas de vertebrados en un dinucleótido diana TA mediante un mecanismo de cortar y pegar. Este sistema se ha utilizado para modificar genéticamente diversos tipos de células de vertebrados, incluyendo leucocitos primarios de sangre periférica humana. En algunos casos, las células se ponen en contacto, incuban y/o tratan con un transposón SB que comprende un gen de carga, p. ej., un gen que codifica un receptor recombinante o un CAR, flanqueado por secuencias SB IR. En casos particulares, las células que se van a transfectar se ponen en contacto con, se incuban y/o tratan con un plásmido que comprende un transposón SB con un gen de carga, p. ej., un gen que codifica un CAR, flanqueado por secuencias SB IR. En determinados casos, el plásmido comprende además un gen que codifica una transposasa SB que no está flanqueada por secuencias SB IR.

PiggyBac (PB) es otro sistema de transposón que puede utilizarse para integrar ADN de carga en un ADN genómico de un hospedador, p. ej., de un ser humano. La transposasa PB reconoce las secuencias de repetición terminal invertida (ITR) específicas del transposón PB situadas en ambos extremos del transposón y desplaza eficazmente el contenido de los sitios originales y lo integra eficientemente en los sitios cromosómicos TTAA. El sistema de transposón PB permite movilizar genes de interés entre las dos ITR del vector PB hacia genomas diana. El sistema PB se ha utilizado para modificar genéticamente diversos tipos de células de vertebrados, incluidas las células humanas primarias. En algunos casos, las células que se van a transfectar se ponen en contacto con, incuban y/o tratan con un transposón PB que comprende un gen de carga, p. ej., un gen que codifica un CAR, flanqueado por secuencias PB IR. En casos particulares, las células que se van a transfectar se ponen en contacto con, incuban y/o tratan con un plásmido que comprende un transposón PB que incluye un gen de carga, p. ej., un gen que codifica un CAR, flanqueado por secuencias PB IR. En determinados casos, el plásmido comprende además un gen que codifica una transposasa SB que no está flanqueada por secuencias PB IR.

En algunos casos, los distintos elementos del transposón/transposasa empleados en los métodos en cuestión, p. ej., vector(es) SB o PB, pueden producirse mediante métodos estándar de escisión por enzimas de restricción, ligación y clonación molecular. Un protocolo para construir los vectores objeto incluye las siguientes etapas. En primer lugar, fragmentos purificados de ácido nucleico que contienen secuencias deseadas de nucleótidos de componentes, así como secuencias extrañas, se escinden con endonucleasas de restricción de fuentes iniciales, p. ej., un vector que comprende el gen de la transposasa. A continuación, los fragmentos que contienen las secuencias de nucleótidos deseadas se separan de los fragmentos no deseados de diferente tamaño mediante métodos de separación convencionales, p. ej., electroforesis en gel de agarosa. Los fragmentos deseados se escinden del gel y se ligan entre sí en la configuración adecuada, de modo que se obtiene un ácido nucleico circular o plásmido que contiene las secuencias deseadas, p. ej., secuencias correspondientes a los distintos elementos de los vectores objeto, como se ha descrito anteriormente. Cuando se desee, las moléculas circulares así construidas se amplifican a continuación en un hospedador procariota, p. ej., *E. coli*. Los procedimientos de escisión, construcción del plásmido, transformación celular y producción de plásmidos implicados en estas etapas son bien conocidos por los expertos en la materia y las enzimas necesarias para la restricción y la ligación están comercializadas. (Véase, por ejemplo, R. Wu, Ed., *Methods in Enzymology*, Vol. 68, Academic Press, N.Y. (1979); T. Maniatis, E. F. Fritsch y J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1982); N.º de catálogo 1982-83, New England Biolabs, Inc.; N.º de catálogo 1982-83, Bethesda Research Laboratories, Inc. Un ejemplo de cómo construir los vectores empleados en los métodos objeto de estudio se proporciona en la sección de Ejemplos, más adelante. La preparación de un sistema de transposón representativo Bella Durmiente también se describe en los documentos WO 98/40510 y WO 99/25817).

En algunos casos, la transducción con transposones se realiza con un plásmido que comprende un gen de transposasa y un plásmido que comprende un transposón que contiene una secuencia de ADN de carga que está flanqueada por secuencias de repetición invertida/repetición directa (IR/DR) que son reconocidas por la transposasa. En determinados casos, la secuencia de ADN de carga codifica una proteína heteróloga, p. ej., un receptor recombinante de linfocitos T o un CAR. En algunos casos, el plásmido comprende la transposasa y el transposón. En algunos casos, la transposasa está bajo el control de un promotor ubicuo, o de cualquier promotor adecuado para dirigir la expresión de la transposasa en la célula diana. Entre los promotores ubicuos se encuentran, pero no se limitan a, EF1a, CMB, SV40, PGK1, Ubc,  $\beta$ -actina humana, CAG, TRE, UAS, Ac5, CaMKIIa, y U6. En algunos casos, el ADN de carga comprende un casete de selección que permite la selección de células con integración estable del ADN de carga en el ADN genómico. Los casetes de selección adecuados incluyen, pero no se limitan a, casetes de selección que codifican un gen de resistencia a la kanamicina, gen de resistencia a la espectinomicina, gen de resistencia a la estreptomina, gen de resistencia a la ampicilina, gen de resistencia a la carbenicilina, gen de resistencia a la higromicina, gen de resistencia a bleomicina, gen de resistencia a la eritromicina y gen de resistencia a la polimixina B.

En algunos casos, los componentes para la transducción con un transposón, p. ej., plásmidos que comprenden una transposasa SB y un transposón SB, se introducen en la célula diana. Se puede emplear cualquier protocolo conveniente, donde el protocolo puede prever la introducción *in vitro* o *in vivo* de los componentes del sistema en la célula diana, en función de la ubicación de la célula diana. Por ejemplo, donde la célula objetivo es una célula aislada, el sistema puede introducirse directamente en la célula en condiciones de cultivo celular que permitan la viabilidad de

la célula diana, p. ej., mediante técnicas de transformación estándar. Tales técnicas incluyen, pero no se limitan necesariamente a: infección vírica, transformación, conjugación, fusión de protoplastos, electroporación, tecnología de pistola de partículas, precipitación con fosfato de calcio, microinyección directa, administración de vectores víricos, y similares. La elección de método depende generalmente del tipo de célula que se esté transformando y de las circunstancias en las que esté teniendo lugar la transformación (es decir, *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*). Puede encontrarse un análisis general de estos métodos en Ausubel, et al., *Short Protocols in Molecular Biology*, 3ª Ed., Wiley & Sons, 1995.

En algunos casos, el transposón SB y la fuente de transposasa SB se introducen en una célula diana de un organismo pluricelular, p. ej., un mamífero o un ser humano, en condiciones suficientes para la escisión del ácido nucleico flanqueado por la repetición invertida del vector portador del transposón y la posterior integración del ácido nucleico escindido en el genoma de la célula diana. Algunos casos comprenden además una etapa para asegurar que la actividad transposasa requerida está presente en la célula diana con relación al transposón introducido. Dependiendo de la estructura del propio vector del transposón, es decir, si el vector incluye o no una región que codifica un producto con actividad transposasa, el método puede incluir además la introducción en la célula diana de un segundo vector que codifique la actividad transposasa requerida.

En algunos casos, la cantidad de ácido nucleico vectorial que comprende el transposón y la cantidad de ácido nucleico vectorial que codifica la transposasa que se introduce en la célula es suficiente para proporcionar la escisión e inserción deseadas del ácido nucleico transposónico en el genoma de la célula diana. Como tal, la cantidad de ácido nucleico vectorial introducido debe proporcionar una cantidad suficiente de actividad transposasa y un número suficiente de copias del ácido nucleico que se desea insertar en la célula diana. La cantidad de ácido nucleico vectorial que se introduce en la célula diana varía en función de la eficacia del protocolo de introducción concreto que se emplee, p. ej., el protocolo de administración *ex vivo* concreto que se emplee.

Una vez que el ADN del vector ha entrado en la célula diana con relación a la transposasa necesaria, la región de ácido nucleico del vector que está flanqueada por repeticiones invertidas, es decir, el ácido nucleico del vector situado entre las repeticiones invertidas reconocidas por la transposasa Bella Durmiente, se escinde del vector mediante la transposasa suministrada y se inserta en el genoma de la célula diana. Como tal, la introducción del ADN vectorial en la célula diana va seguida de la posterior escisión mediada por transposasa y la inserción del ácido nucleico exógeno transportado por el vector en el genoma de la célula diana. En casos particulares, el vector se integra en los genomas de al menos un 1 %, al menos un 2 %, al menos un 3 %, al menos un 4 %, al menos un 5 %, al menos un 6 %, al menos un 7 %, al menos un 8 %, al menos un 9 %, al menos un 10 %, al menos un 15 %, o al menos un 20 % de las células transfectadas con el transposón SB y/o la transposasa SB. En algunos casos, la integración del ácido nucleico en el genoma de la célula diana es estable, es decir, el ácido nucleico del vector permanece presente en el genoma de la célula diana durante más de un periodo transitorio y transmite una parte del material genético cromosómico a la progenie de la célula diana.

En determinados casos, los transposones se utilizan para integrar ácidos nucleicos, es decir, polinucleótidos, de diversos tamaños en el genoma de la célula diana. En algunos casos, el tamaño del ADN que se inserta en el genoma de una célula diana utilizando los métodos objeto de estudio varía de aproximadamente 0,1 kb a 200 kb, de aproximadamente 0,5 kb a 100 kb, de aproximadamente 1,0 kb a aproximadamente 8,0 kb, de aproximadamente 1,0 kb a aproximadamente 200 kb, de aproximadamente 1,0 kb a aproximadamente 10 kb, de aproximadamente 10 kb a aproximadamente 50 kb, de aproximadamente 50 kb a aproximadamente 100 kb, o de aproximadamente 100 kb a aproximadamente 200 kb. En algunos casos, el tamaño del ADN que se inserta en el genoma de una célula diana utilizando los métodos objeto varía de aproximadamente 1,0 kb a aproximadamente 8,0 kb. En algunos casos, el tamaño del ADN que se inserta en el genoma de una célula diana utilizando los métodos objeto varía de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 200 kb. En casos particulares, el tamaño del ADN que se inserta en el genoma de una célula diana utilizando los métodos objeto varía de aproximadamente 1,0 kb a 8,0 kb aproximadamente.

#### D. Cultivo y/o expansión de células

En algunos casos, los métodos divulgados incluyen una o más etapas para cultivar células, p. ej., cultivar células en condiciones que promueven la proliferación y/o expansión. En algunos casos, las células se cultivan en condiciones que promueven la proliferación y/o expansión tras una etapa de modificación genética, p. ej., introducción de un polipéptido recombinante en las células mediante transducción o transfección. En casos particulares, las células se cultivan después de haber sido incubadas en condiciones de estimulación y transducidas o transfectadas con un polinucleótido recombinante, p. ej., un polinucleótido que codifica un receptor recombinante. En algunos casos, el cultivo produce una o más composiciones cultivadas de linfocitos T enriquecidos.

En determinados casos, una o más composiciones de linfocitos T enriquecidos, incluidos los linfocitos T estimulados y transducidos, tal como las composiciones separadas de dichos linfocitos T CD4+ y CD8+, se cultivan, p. ej., en condiciones que promueven la proliferación y/o expansión, antes de formular las células. En algunos casos, los métodos de cultivo, tales como para promover la proliferación y/o expansión incluyen los métodos divulgados en el presente documento, tal como en la Sección I-F. En casos particulares, una o más composiciones de linfocitos T

enriquecidos se cultivan después de que la una o más composiciones hayan sido modificadas genéticamente, p. ej., transducidas o transfectadas. En casos particulares, la una o más composiciones son composiciones modificadas genéticamente. En casos particulares, la una o más composiciones modificadas genéticamente se han crioprotegido y almacenado previamente, y se descongelan antes del cultivo.

5 En determinados casos, la una o más composiciones de linfocitos T modificados genéticamente son o incluyen dos composiciones separadas de linfocitos T enriquecidos. En casos particulares, dos composiciones de linfocitos T enriquecidos separadas, p. ej., dos composiciones de linfocitos T enriquecidos separadas seleccionadas, aisladas y/o enriquecidas a partir de la misma muestra biológica, en las que se introduce un receptor recombinante (p. ej., CAR),  
10 se cultivan por separado en condiciones que promueven la proliferación y/o expansión de las células. En algunos casos, las condiciones son de estimulación. En determinados casos, las dos composiciones separadas incluyen una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos, tales como linfocitos T CD4+ modificados genéticamente que se introdujeron con el ácido nucleico que codifica el receptor recombinante y/o que expresan el receptor recombinante. En casos particulares, las dos composiciones separadas incluyen una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos,  
15 tales como linfocitos T CD8+ modificados genéticamente que se introdujeron con el ácido nucleico que codifica el receptor recombinante y/o que expresan el receptor recombinante. En algunos casos, dos composiciones de linfocitos T CD4+ enriquecidos y linfocitos T CD8+ enriquecidos separadas, tales como linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ modificados genéticamente, se cultivan por separado, p. ej., en condiciones que promueven la proliferación y/o expansión. En algunos casos, se cultiva una composición única de linfocitos T enriquecidos. En determinados casos,  
20 la composición única es una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos. En algunos casos, la composición única es una composición de linfocitos T CD4+ y CD8+ enriquecidos que se han combinado a partir de composiciones separadas antes del cultivo.

En algunos casos, la composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos, tales como los linfocitos T CD4+ modificados genéticamente, que se cultivan, p. ej., en condiciones que promueven la proliferación y/o expansión, incluye al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 %, al menos un 99,9 %, o un o aproximadamente un 100 % de linfocitos T CD4+. En algunos casos, la composición incluye al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 %, al menos un 99,9 %, o un o aproximadamente un 100 % de linfocitos T CD4+ que expresan el receptor recombinante y/o han sido transducidos o transfectados con el polinucleótido recombinante que codifica el receptor recombinante. En determinados casos, la composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos que se cultiva incluye menos del 40 %, menos del 35 %, menos del 30 %, menos del 25 %, menos del 20 %, menos del 15 %, menos del 10 %, menos del 5 %, menos del 1 %, menos del 0,1 %, o menos del 0,01 % de linfocitos T CD8+, y/o no contiene linfocitos T CD8+, y/o está exenta o sustancialmente exenta de linfocitos T CD8+.

En algunos casos, la composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos, tales como los linfocitos T CD8+ modificados genéticamente, que se cultivan, p. ej., en condiciones que promueven la proliferación y/o expansión, incluye al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 %, al menos un 99,9 %, o un o aproximadamente un 100 % de linfocitos T CD8+. En casos particulares, la composición incluye al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 %, al menos un 99,9 %, o un o aproximadamente un 100 % de linfocitos T CD8+ que expresan el receptor recombinante y/o han sido transducidos o transfectados con el polinucleótido recombinante que codifica el receptor recombinante. En determinados casos, la composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos que se incuban en condiciones de estimulación incluye menos del 40 %, menos del 35 %, menos del 30 %, menos del 25 %, menos del 20 %, menos del 15 %, menos del 10 %, menos del 5 %, menos del 1 %, menos del 0,1 %, o menos del 0,01 % de linfocitos T CD4+, y/o no contiene linfocitos T CD4+, y/o está exenta o sustancialmente exenta de linfocitos T CD4+.

En algunos casos, las composiciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ enriquecidos separadas, tales como las composiciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ modificados genéticamente separadas, se combinan en una única composición y se cultivan, p. ej., en condiciones que promueven la proliferación y/o expansión. En determinados casos, las composiciones cultivadas de linfocitos T CD4+ enriquecidos y CD8+ enriquecidas separadas se combinan en una única composición una vez realizado y/o completado el cultivo. En casos particulares, las composiciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ enriquecidos separadas, tales como las composiciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ modificados genéticamente separadas, se cultivan por separado, p. ej., en condiciones que promueven la proliferación y/o expansión.

En algunos casos, las células, p. ej., las células modificadas genéticamente se cultivan en un volumen de medio que es, de aproximadamente, o es de al menos 100 ml, 200 ml, 300 ml, 400 ml, 500 ml, 600 ml, 700 ml, 800 ml, 900 ml, 1.000 ml, 1.200 ml, 1.400 ml, 1.600 ml, 1.800 ml, 2.000 ml, 2.200 ml o 2.400 ml. En algunos casos, las células se cultivan a un volumen inicial que posteriormente se ajusta a un volumen diferente. En casos particulares, el volumen se ajusta posteriormente durante el cultivo. En casos particulares, el volumen se incrementa a partir del volumen inicial durante el cultivo. En determinados casos, el volumen aumenta cuando las células alcanzan una densidad durante el

cultivo. En un determinado caso, el volumen inicial es o es aproximadamente 500 ml.

En casos particulares, el volumen se incrementa a partir del volumen inicial cuando las células alcanzan una densidad o concentración durante el cultivo. En casos particulares, el volumen se incrementa cuando las células alcanzan una densidad y/o concentración de, de aproximadamente, o de al menos  $0,1 \times 10^6$  células/ml,  $0,2 \times 10^6$  células/ml,  $0,4 \times 10^6$  células/ml,  $0,6 \times 10^6$  células/ml,  $0,8 \times 10^6$  células/ml,  $1 \times 10^6$  células/ml,  $1,2 \times 10^6$  células/ml,  $1,4 \times 10^6$  células/ml,  $1,6 \times 10^6$  células/ml,  $1,8 \times 10^6$  células/ml,  $2,0 \times 10^6$  células/ml,  $2,5 \times 10^6$  células/ml,  $3,0 \times 10^6$  células/ml,  $3,5 \times 10^6$  células/ml,  $4,0 \times 10^6$  células/ml,  $4,5 \times 10^6$  células/ml,  $5,0 \times 10^6$  células/ml,  $6 \times 10^6$  células/ml,  $8 \times 10^6$  células/ml, o  $10 \times 10^6$  células/ml. En algunos casos, el volumen se incrementa a partir del volumen inicial cuando las células alcanzan una densidad y/o concentración de, de al menos, o de aproximadamente  $0,6 \times 10^6$  células/ml. En algunos casos, la densidad y/o la concentración es de células viables en el cultivo. En casos particulares, el volumen se incrementa cuando las células alcanzan una densidad y/o concentración de, de aproximadamente, o de al menos  $0,1 \times 10^6$  células viables/ml,  $0,2 \times 10^6$  células viables/ml,  $0,4 \times 10^6$  células viables/ml,  $0,6 \times 10^6$  células viables/ml,  $0,8 \times 10^6$  células viables/ml,  $1 \times 10^6$  células viables/ml,  $1,2 \times 10^6$  células viables/ml,  $1,4 \times 10^6$  células viables/ml,  $1,6 \times 10^6$  células viables/ml,  $1,8 \times 10^6$  células viables/ml,  $2,0 \times 10^6$  células viables/ml,  $2,5 \times 10^6$  células viables/ml,  $3,0 \times 10^6$  células viables/ml,  $3,5 \times 10^6$  células viables/ml,  $4,0 \times 10^6$  células viables/ml,  $4,5 \times 10^6$  células viables/ml,  $5,0 \times 10^6$  células viables/ml,  $6 \times 10^6$  células viables/ml,  $8 \times 10^6$  células viables/ml, o  $10 \times 10^6$  células viables/ml. En algunos casos, el volumen se incrementa a partir del volumen inicial cuando las células viables alcanzan una densidad y/o concentración de, de al menos, o de aproximadamente  $0,6 \times 10^6$  células viables/ml. En algunos casos, la densidad y/o concentración de las células o células viables puede determinarse o controlarse durante el cultivo, tal como utilizando los métodos descritos, incluidos los métodos ópticos, incluida la microscopía de holografía digital (DHM) o la microscopía de holografía digital diferencial (DDHM).

En algunos casos, las células alcanzan una densidad y/o concentración, y el volumen se incrementa en, en aproximadamente, o en al menos 100 ml, 200 ml, 300 ml, 400 ml, 500 ml, 600 ml, 700 ml, 800 ml, 900 ml, 1.000 ml, 1.200 ml, 1.400 ml, 1.600 ml, 1.800 ml, 2.000 ml, 2.200 ml o 2.400 ml. En algunos casos, el volumen se incrementa en 500 ml. En casos particulares, el volumen se incrementa hasta a un volumen de, de aproximadamente, o de al menos 500 ml, 600 ml, 700 ml, 800 ml, 900 ml, 1.000 ml, 1.200 ml, 1.400 ml, 1.600 ml, 1.800 ml, 2.000 ml, 2.200 ml o 2.400 ml. En determinados casos, el volumen se incrementa hasta a un volumen de 1.000 ml. En determinados casos, el volumen se incrementa a una tasa de, de al menos, o de aproximadamente 5 ml, 10 ml, 20 ml, 25 ml, 30 ml, 40 ml, 50 ml, 60 ml, 70 ml, 75 ml, 80 ml, 90 ml, o 100 ml, cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 minutos. En determinados casos, la tasa es o es aproximadamente 50 ml cada 8 minutos.

En algunos casos, una composición de linfocitos T enriquecidos, tal como linfocitos T modificados genéticamente, se cultiva en condiciones que promueven la proliferación y/o la expansión. En algunos casos, tales condiciones pueden estar diseñadas para inducir la proliferación, expansión, activación y/o supervivencia de células en la población. En casos particulares, las condiciones de estimulación pueden incluir uno o más de medios particulares, temperatura, contenido de oxígeno, contenido de dióxido de carbono, tiempo, agentes, p. ej., nutrientes, aminoácidos, antibióticos, iones y/o factores estimulantes, tales como citocinas, quimiocinas, antígenos, compañeros de unión, proteínas de fusión, receptores solubles recombinantes, y cualquier otro agente diseñado para promover el crecimiento, división y/o expansión de las células.

En algunos casos, el cultivo se realiza en condiciones que generalmente incluyen una temperatura adecuada para el crecimiento de células inmunitarias primarias, tales como los linfocitos T humanos, por ejemplo, al menos aproximadamente 25 grados Celsius, generalmente al menos aproximadamente 30 grados, y generalmente o aproximadamente 37 grados Celsius. En algunos casos, la composición de linfocitos T enriquecidos se incuba a una temperatura de 25 a 38 °C, tal como de 30 a 37 °C, por ejemplo, a o aproximadamente  $37 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ . En algunos casos, la incubación se lleva a cabo durante un periodo de tiempo hasta el cultivo, por ejemplo, cultivo o expansión, y da como resultado una densidad, concentración, número o dosis de células deseado o umbral. En algunos casos, la incubación se lleva a cabo durante un periodo de tiempo hasta el cultivo, por ejemplo, cultivo o expansión, y da como resultado una densidad, concentración, número o dosis de células viables deseado o umbral. En algunos casos, la incubación es superior a o superior a aproximadamente o es durante aproximadamente 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días o más. En algunos casos, la densidad, la concentración y/o el número o la dosis de las células pueden determinarse o controlarse durante el cultivo, tal como utilizando los métodos descritos, incluidos los métodos ópticos, incluida la microscopía de holografía digital (DHM) o la microscopía de holografía digital diferencial (DDHM).

En algunos casos, el reactivo estimulador se elimina y/o se separa de las células antes del cultivo. En determinados casos, el agente estimulador se elimina y/o se separa de las células después de la modificación genética y antes del cultivo de las células modificadas genéticamente, p. ej., en condiciones que promueven la proliferación y/o expansión. En algunos casos, el reactivo estimulador es un reactivo estimulador que se describe en el presente documento, p. ej., en la Sección I-B-1. En casos particulares, el reactivo estimulador se elimina y/o se separa de las células como se describe en el presente documento, p. ej., en la Sección I-B-2.

En casos particulares, una composición de linfocitos T enriquecidos, tal como linfocitos T modificados genéticamente, por ejemplo, composiciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> modificados genéticamente y linfocitos T CD8<sup>+</sup> modificados

genéticamente separadas, se cultiva en presencia de una o más citocinas. En determinados casos, la una o más citocinas son citocinas recombinantes. En casos particulares, la una o más citocinas son citocinas recombinantes humanas. En determinados casos, las una o más citocinas se unen y/o son capaces de unirse a receptores que son expresados por y/o son endógenos de los linfocitos T. En casos particulares, la una o más citocinas son o incluyen un miembro de la familia de citocinas del haz de 4 hélices alfa. En algunos casos, los miembros de la familia de citocinas del haz de 4 hélices alfa incluyen, pero no se limitan a, interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-7 (IL-7), interleucina-9 (IL-9), interleucina-12 (IL-12), interleucina-15 (IL-15), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) y factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). En algunos casos, la una o más citocinas es o incluye IL-15. En casos particulares, la una o más citocinas es o incluye IL-7. En casos particulares, la una o más citocinas es o incluye IL-2 recombinante.

En casos particulares, la composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos, tales como los linfocitos T CD4+ modificados genéticamente, se cultiva con IL-2 recombinante. En algunos casos, cultivar una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos, tales como los linfocitos T CD4+ modificados genéticamente, en presencia de IL-2 recombinante aumenta la probabilidad de que los linfocitos T CD4+ de la composición sigan sobreviviendo, multiplicándose, expandiéndose y/o activándose durante la etapa de cultivo y a lo largo de todo el proceso. En algunos casos, cultivar la composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos, tales como los linfocitos T CD4+ modificados genéticamente, en presencia de IL-2 recombinante aumenta la probabilidad y/o posibilidad de que se produzca una composición de salida de linfocitos T CD4+ enriquecidos, p. ej., linfocitos T CD4+ modificados genéticamente adecuados para la terapia celular, a partir de la composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos en al menos un 0,5%, al menos un 1 %, al menos un 2 %, al menos un 3 %, al menos un 4 %, al menos un 5 %, al menos un 6 %, al menos un 7 %, al menos un 8 %, al menos un 9 %, al menos un 10 %, al menos un 11 %, al menos un 12 %, al menos un 13 %, al menos un 14 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 100 %, o al menos un 200 % de CD4+ en comparación con un método alternativo y/o ilustrativo que no cultiva la composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos en presencia de IL-2 recombinante.

En algunos casos, las células, tales como las composiciones de linfocitos T CD4+ modificados genéticamente y linfocitos T CD8+ modificados genéticamente separadas, se cultivan con una citocina, p. ej., una citocina humana recombinante, a una concentración de entre 1 UI/ml y 2.000 UI/ml, entre 10 UI/ml y 100 UI/ml, entre 50 UI/ml y 500 UI/ml, entre 100 UI/ml y 200 UI/ml, entre 500 UI/ml y 1400 UI/ml, entre 250 UI/ml y 500 UI/ml, o entre 500 UI/ml y 2.500 UI/ml.

En algunos casos, una composición de linfocitos T enriquecidos, tales como composiciones de linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ modificados genéticamente separadas, se cultiva con IL-2 recombinante, p. ej., IL-2 humana recombinante, a una concentración comprendida entre 2 UI/ml y 500 UI/ml, entre 10 UI/ml y 250 UI/ml, entre 100 UI/ml y 500 UI/ml, o entre 100 UI/ml y 400 UI/ml. En casos particulares, la composición de linfocitos T enriquecidos se cultiva con IL-2 a una concentración igual o superior a 50 UI/ml, 75 UI/ml, 100 UI/ml, 125 UI/ml, 150 UI/ml, 175 UI/ml, 200 UI/ml, 225 UI/ml, 250 UI/ml, 300 UI/ml o 400 UI/ml. En algunos casos, la composición de linfocitos T enriquecidos se cultiva con IL-2 recombinante a una concentración de 200 UI/ml. En algunos casos, la composición de linfocitos T enriquecidos es una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos, tal como una composición de linfocitos T CD4+ modificados genéticamente. En casos particulares, la composición de linfocitos T enriquecidos es una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos, tal como una composición de linfocitos T CD8+ modificados genéticamente.

En algunos casos, una composición de linfocitos T enriquecidos, tales como composiciones de linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ modificados genéticamente separadas, se cultiva con IL-7, p. ej., IL-7 humana recombinante, a una concentración comprendida entre 10 UI/ml y 5.000 UI/ml, entre 500 UI/ml y 2.000 UI/ml, entre 600 UI/ml y 1.500 UI/ml, entre 500 UI/ml y 2.500 UI/ml, entre 750 UI/ml y 1.500 UI/ml, o entre 1.000 UI/ml y 2.000 UI/ml. En casos particulares, la composición de linfocitos T enriquecidos se cultiva con IL-7 a una concentración igual o superior a 100 UI/ml, 200 UI/ml, 300 UI/ml, 400 UI/ml, 500 UI/ml, 600 UI/ml, 700 UI/ml, 800 UI/ml, 900 UI/ml, 1.000 UI/ml, 1.200 UI/ml, 1.400 UI/ml o 1.600 UI/ml. En algunos casos, las células se cultivan en presencia de IL-7 recombinante a una concentración de o de aproximadamente 1.200 UI/ml. En algunos casos, la composición de linfocitos T enriquecidos es una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos, tal como linfocitos T CD4+ modificados genéticamente.

En algunos casos, una composición de linfocitos T enriquecidos, tales como composiciones de linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ modificados genéticamente separadas, se cultiva con IL-15, p. ej., IL-15 humana recombinante, a una concentración comprendida entre 0,1 UI/ml y 200 UI/ml, entre 1 UI/ml y 50 UI/ml, entre 5 UI/ml y 25 UI/ml, entre 25 UI/ml y 50 UI/ml, entre 5 UI/ml y 15 UI/ml, o entre 10 UI/ml y 00 UI/ml. En casos particulares, la composición de linfocitos T enriquecidos se cultiva con IL-15 a una concentración igual o superior a 1 UI/ml, 2 UI/ml, 3 UI/ml, 4 UI/ml, 5 UI/ml, 6 UI/ml, 7 UI/ml, 8 UI/ml, 9 UI/ml, 10 UI/ml, 11 UI/ml, 12 UI/ml, 13 UI/ml, 14 UI/ml, 15 UI/ml, 20 UI/ml, 25 UI/ml, 30 UI/ml, 40 UI/ml, 50 UI/ml, 100 UI/ml o 200 UI/ml. En casos particulares, una composición de linfocitos T enriquecidos se cultiva con IL-15 recombinante a una concentración de 20 UI/ml. En algunos casos, la composición de linfocitos T enriquecidos es una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos, tal como linfocitos T CD4+ modificados genéticamente. En casos particulares, la composición de linfocitos T enriquecidos es una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos, tal como linfocitos T CD8+ modificados genéticamente.

- En casos particulares, una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos, tales como los linfocitos T CD8+ modificados genéticamente, se cultiva en presencia de IL-2 y/o IL-15, tal como en las cantidades como se describe. En determinados casos, una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos, tales como los linfocitos T CD4+ modificados genéticamente, se cultiva en presencia de IL-2, IL-7 y/o IL-15, tal como en las cantidades como se describe. En algunos casos, la IL-2, la IL-7 y/o la IL-15 son recombinantes. En determinados casos, la IL-2, la IL-7 y/o la IL-15 son humanas. En casos particulares, la una o más citocinas son o incluyen IL-2, IL-7 y/o IL-15 recombinante humana.
- En casos particulares, el cultivo se realiza en un sistema cerrado. En determinados casos, el cultivo se realiza en un sistema cerrado en condiciones estériles. En casos particulares, el cultivo se realiza en el mismo sistema cerrado que una o más etapas de los sistemas proporcionados. En algunos casos, la composición de linfocitos T enriquecidos se elimina de un sistema cerrado y se coloca y/o se conecta a un biorreactor para el cultivo. Entre los ejemplos de biorreactores adecuados para el cultivo se incluyen, pero no se limitan a, GE Xuri W25, GE Xuri W5, Sartorius BioSTAT RM 20 | 50, Finesse SmartRocker Bioreactor Systems, y Pall XRS Bioreactor Systems. En algunos casos, el biorreactor se utiliza para perfundir y/o mezclar las células durante al menos una parte de la etapa de cultivo.
- En algunos casos, las células cultivadas en recinto cerrado, conectadas y/o bajo el control de un biorreactor experimentan una expansión durante el cultivo más rápida que las células que se cultivan sin un biorreactor, p. ej., células que se cultivan en condiciones estáticas tal como sin mezclado, balanceo, movimiento y/o perfusión. En algunos casos, las células cultivadas en recinto cerrado, conectadas y/o bajo el control de un biorreactor alcanzan o logran un umbral de expansión, recuento de células y/o densidad en un plazo de 14 días, 10 días, 9 días, 8 días, 7 días, 6 días, 5 días, 4 días, 3 días, 2 días, 60 horas, 48 horas, 36 horas, 24 horas u 12 horas. En algunos casos, las células cultivadas en recinto cerrado, conectadas y/o bajo el control de un biorreactor alcanzan o logran un umbral de expansión, recuento de células y/o densidad de al menos en un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 100 %, al menos un 150 %, al menos 1 vez, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces más que las células cultivadas en un proceso ilustrativo y/o alternativo donde las células no están cultivadas en recinto cerrado, conectadas y/o bajo el control de un biorreactor.
- En algunos casos, la mezcla es o incluye balanceo y/o movimiento. En algunos casos, el biorreactor puede estar sometido a movimiento o balanceo, que, en algunos casos, puede aumentar la transferencia de oxígeno. El movimiento del biorreactor puede incluir, pero no se limita a la rotación a lo largo de un eje horizontal, girando a lo largo de un eje vertical, un movimiento de balanceo a lo largo de un eje horizontal ladeado o inclinado del biorreactor o cualquier combinación de los mismos. En algunos casos, al menos una parte de la incubación se lleva a cabo con balanceo. La velocidad y el ángulo de balanceo pueden ajustarse para conseguir la agitación deseada. En algunos casos, el ángulo de balanceo es de 20°, 19°, 18°, 17°, 16°, 15°, 14°, 13°, 12°, 11°, 10°, 9°, 8°, 7°, 6°, 5°, 4°, 3°, 2° o 1°. En determinados casos, el ángulo de balanceo es entre 6-16°. En otros casos, el ángulo de balanceo es entre 7-16°. En otros casos, el ángulo de balanceo es entre 8-12°. En algunos casos, la velocidad de balanceo es de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 rpm. En algunos casos, la velocidad de balanceo es entre 4 y 12 rpm, tal como entre 4 y 6 rpm, ambos inclusive.
- En algunos casos, el biorreactor mantiene la temperatura en o cerca de 37 °C y niveles de CO<sub>2</sub> en o cerca del 5 % con un flujo de aire constante de, aproximadamente, o al menos, 0,01 l/min, 0,05 l/min, 0,1 l/min, 0,2 l/min, 0,3 l/min, 0,4 l/min, 0,5 l/min, 1,0 l/min, 1,5 l/min, o 2,0 l/min o más de 2,0 l/min. En determinados casos, al menos una parte del cultivo se realiza con perfusión, tal como a una tasa de 290 ml/día, 580 ml/día y/o 1160 ml/día, p. ej., dependiendo del momento con relación al inicio del cultivo y/o la densidad de las células cultivadas. En algunos casos, al menos una parte de la expansión del cultivo celular se realiza con un movimiento de balanceo, tal como en un ángulo de entre 5° y 10°, tal como 6°, a una velocidad de balanceo constante, tal como una velocidad de entre 5 y 15 RPM, tal como 6 RMP o 10 RPM.
- En algunos casos, al menos una parte de la etapa de cultivo se realiza en perfusión constante, p. ej., una perfusión a un ritmo lento y constante. En algunos casos, la perfusión es o incluye una salida de líquido, p. ej., medios usados, y una entrada de medios frescos. En determinados casos, la perfusión sustituye los medios utilizados por medios frescos. En algunos casos, al menos una parte del cultivo se realiza bajo perfusión a una velocidad constante de o de aproximadamente o de al menos 100 ml/día, 200 ml/día, 250 ml/día, 275 ml/día, 290 ml/día, 300 ml/día, 350 ml/día, 400 ml/día, 450 ml/día, 500 ml/día, 550 ml/día, 575 ml/día, 580 ml/día, 600 ml/día, 650 ml/día, 700 ml/día, 750 ml/día, 800 ml/día, 850 ml/día, 900 ml/día, 950 ml/día, 1000 ml/día, 1100 ml/día, 1160 ml/día, 1200 ml/día, 1400 ml/día, 1600 ml/día, 1800 ml/día, 2000 ml/día, 2200 ml/día o 2400 ml/día.
- En casos particulares, el cultivo se inicia en condiciones sin perfusión, y la perfusión se inicia tras un tiempo establecido y/o predeterminado, tal como o como aproximadamente al menos 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 60 horas, 72 horas, o más de 72 horas después del inicio o comienzo del cultivo. En casos particulares, la perfusión se inicia cuando la densidad o concentración de las células alcanza una densidad o concentración establecida o predeterminada. En algunos casos, la perfusión se inicia cuando las células cultivadas alcanzan una densidad o concentración de, de aproximadamente, o al menos 0,1 x 10<sup>6</sup> células/ml, 0,2 x 10<sup>6</sup> células/ml, 0,4 x 10<sup>6</sup> células/ml, 0,6 x 10<sup>6</sup> células/ml, 0,8 x 10<sup>6</sup> células/ml, 1 x 10<sup>6</sup> células/ml, 1,2 x 10<sup>6</sup> células/ml, 1,4 x 10<sup>6</sup> células/ml, 1,6 x 10<sup>6</sup> células/ml,

1,8 x 10<sup>6</sup> células/ml, 2,0 x 10<sup>6</sup> células/ml, 2,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, 3,0 x 10<sup>6</sup> células/ml, 3,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, 4,0 x 10<sup>6</sup> células/ml, 4,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, 5,0 x 10<sup>6</sup> células/ml, 6 x 10<sup>6</sup> células/ml, 8 x 10<sup>6</sup> células/ml, o 10 x 10<sup>6</sup> células/ml. En casos particulares, la perfusión se inicia cuando la densidad o concentración de células viables alcanza una densidad o concentración establecida o predeterminada. En algunos casos, la perfusión se inicia cuando las células viables cultivadas alcanzan una densidad o concentración de, de aproximadamente, o al menos 0,1 x 10<sup>6</sup> células viables/ml, 0,2 x 10<sup>6</sup> células viables/ml, 0,4 x 10<sup>6</sup> células viables/ml, 0,6 x 10<sup>6</sup> células viables/ml, 0,8 x 10<sup>6</sup> células viables/ml, 1 x 10<sup>6</sup> células viables/ml, 1,2 x 10<sup>6</sup> células viables/ml, 1,4 x 10<sup>6</sup> células viables/ml, 1,6 x 10<sup>6</sup> células viables/ml, 1,8 x 10<sup>6</sup> células viables/ml, 2,0 x 10<sup>6</sup> células viables/ml, 2,5 x 10<sup>6</sup> células viables/ml, 3,0 x 10<sup>6</sup> células viables/ml, 3,5 x 10<sup>6</sup> células viables/ml, 4,0 x 10<sup>6</sup> células viables/ml, 4,5 x 10<sup>6</sup> células viables/ml, 5,0 x 10<sup>6</sup> células viables/ml, 6 x 10<sup>6</sup> células viables/ml, 8 x 10<sup>6</sup> células viables/ml, o 10 x 10<sup>6</sup> células viables/ml.

En casos particulares, la perfusión se realiza a diferentes velocidades durante el cultivo. Por ejemplo, en algunos casos, la tasa de perfusión depende de la densidad y/o concentración de las células cultivadas. En determinados casos, la tasa de perfusión se incrementa cuando las células alcanzan una densidad o concentración establecida o predeterminada. La tasa de perfusión puede cambiar, p. ej., cambiar de una tasa de perfusión constante a una tasa de perfusión constante aumentada, una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, más de cinco veces, más de diez veces, más de 15 veces, más de 20 veces, más de 25 veces, más de 50 veces, o más de 100 veces durante el cultivo. En algunos casos, la tasa de perfusión constante aumenta cuando las células alcanzan una densidad o concentración celular establecida o predeterminada de, de aproximadamente, o al menos 0,6 x 10<sup>6</sup> células/ml, 0,8 x 10<sup>6</sup> células/ml, 1 x 10<sup>6</sup> células/ml, 1,2 x 10<sup>6</sup> células/ml, 1,4 x 10<sup>6</sup> células/ml, 1,6 x 10<sup>6</sup> células/ml, 1,8 x 10<sup>6</sup> células/ml, 2,0 x 10<sup>6</sup> células/ml, 2,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, 3,0 x 10<sup>6</sup> células/ml, 3,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, 4,0 x 10<sup>6</sup> células/ml, 4,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, 5,0 x 10<sup>6</sup> células/ml, 6 x 10<sup>6</sup> células/ml, 8 x 10<sup>6</sup> células/ml, o 10 x 10<sup>6</sup> células/ml. En algunos casos, la tasa de perfusión constante aumenta cuando las células alcanzan una densidad o concentración de células viables establecida o predeterminada de, de aproximadamente, o al menos 0,6 x 10<sup>6</sup> células viables/ml, 0,8 x 10<sup>6</sup> células viables/ml, 1 x 10<sup>6</sup> células viables/ml, 1,2 x 10<sup>6</sup> células viables/ml, 1,4 x 10<sup>6</sup> células viables/ml, 1,6 x 10<sup>6</sup> células viables/ml, 1,8 x 10<sup>6</sup> células viables/ml, 2,0 x 10<sup>6</sup> células viables/ml, 2,5 x 10<sup>6</sup> células viables/ml, 3,0 x 10<sup>6</sup> células viables/ml, 3,5 x 10<sup>6</sup> células viables/ml, 4,0 x 10<sup>6</sup> células viables/ml, 4,5 x 10<sup>6</sup> células viables/ml, 5,0 x 10<sup>6</sup> células viables/ml, 6 x 10<sup>6</sup> células viables/ml, 8 x 10<sup>6</sup> células viables/ml, o 10 x 10<sup>6</sup> células viables/ml. En algunos casos, la densidad y/o concentración de las células o de las células viables durante el cultivo, tal como con perfusión, puede determinarse o controlarse, tal como utilizando los métodos descritos, incluidos los métodos ópticos, incluida la microscopía de holografía digital (DHM) o la microscopía de holografía digital diferencial (DDHM).

En algunos casos, el cultivo se inicia en condiciones sin perfusión, y, la perfusión se inicia cuando la densidad o concentración de las células alcanza una densidad o concentración establecida o predeterminada. En algunos casos, la perfusión se inicia a una velocidad de, de aproximadamente, o de al menos 100 ml/día, 200 ml/día, 250 ml/día, 275 ml/día, 290 ml/día, 300 ml/día, 350 ml/día, 400 ml/día, 450 ml/día, 500 ml/día, 550 ml/día, 575 ml/día, 580 ml/día, 600 ml/día, 650 ml/día, 700 ml/día, 750 ml/día, 800 ml/día, 850 ml/día, 900 ml/día, 950 ml/día, 1000 ml/día, 1100 ml/día, 1160 ml/día, 1200 ml/día, 1400 ml/día, 1600 ml/día, 1800 ml/día, 2000 ml/día, 2200 ml/día, o 2400 ml/día cuando la densidad o concentración de las células alcanza una densidad o concentración establecida o predeterminada. En algunos casos, la perfusión se inicia cuando las células cultivadas o las células viables cultivadas alcanzan una densidad o concentración de, de aproximadamente, o al menos 0,1 x 10<sup>6</sup> células/ml, 0,2 x 10<sup>6</sup> células/ml, 0,4 x 10<sup>6</sup> células/ml, 0,6 x 10<sup>6</sup> células/ml, 0,8 x 10<sup>6</sup> células/ml, 1 x 10<sup>6</sup> células/ml, 1,2 x 10<sup>6</sup> células/ml, 1,4 x 10<sup>6</sup> células/ml, 1,6 x 10<sup>6</sup> células/ml, 1,8 x 10<sup>6</sup> células/ml, 2,0 x 10<sup>6</sup> células/ml, 2,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, 3,0 x 10<sup>6</sup> células/ml, 3,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, 4,0 x 10<sup>6</sup> células/ml, 4,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, 5,0 x 10<sup>6</sup> células/ml, 6 x 10<sup>6</sup> células/ml, 8 x 10<sup>6</sup> células/ml, o 10 x 10<sup>6</sup> células/ml.

En determinados casos, al menos una parte del cultivo se realiza con perfusión a una velocidad determinada, y la tasa de perfusión se incrementa hasta, a aproximadamente, o al menos 100 ml/día, 200 ml/día, 250 ml/día, 275 ml/día, 290 ml/día, 300 ml/día, 350 ml/día, 400 ml/día, 450 ml/día, 500 ml/día, 550 ml/día, 575 ml/día, 580 ml/día, 600 ml/día, 650 ml/día, 700 ml/día, 750 ml/día, 800 ml/día, 850 ml/día, 900 ml/día, 950 ml/día, 1000 ml/día, 1100 ml/día, 1160 ml/día, 1200 ml/día, 1400 ml/día, 1600 ml/día, 1800 ml/día, 2000 ml/día, 2200 ml/día, o 2400 ml/día cuando la densidad o concentración de las células alcanza una densidad o concentración establecida o predeterminada. En algunos casos, la perfusión se inicia cuando las células cultivadas o las células viables cultivadas alcanzan una densidad o concentración de, de aproximadamente, o al menos 0,1 x 10<sup>6</sup> células/ml, 0,2 x 10<sup>6</sup> células/ml, 0,4 x 10<sup>6</sup> células/ml, 0,6 x 10<sup>6</sup> células/ml, 0,8 x 10<sup>6</sup> células/ml, 1 x 10<sup>6</sup> células/ml, 1,2 x 10<sup>6</sup> células/ml, 1,4 x 10<sup>6</sup> células/ml, 1,6 x 10<sup>6</sup> células/ml, 1,8 x 10<sup>6</sup> células/ml, 2,0 x 10<sup>6</sup> células/ml, 2,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, 3,0 x 10<sup>6</sup> células/ml, 3,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, 4,0 x 10<sup>6</sup> células/ml, 4,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, 5,0 x 10<sup>6</sup> células/ml, 6 x 10<sup>6</sup> células/ml, 8 x 10<sup>6</sup> células/ml, o 10 x 10<sup>6</sup> células/ml. En algunos casos, la perfusión se realiza cuando las células se cultivan en un volumen de, de aproximadamente, o al menos 300 ml, 400 ml, 500 ml, 600 ml, 700 ml, 800 ml, 900 ml o 1000 ml. En algunos casos, el volumen es de 1000 ml.

En determinados casos, el cultivo se inicia en condiciones de ausencia de perfusión o de perfusión a una tasa determinada, y la tasa de perfusión se incrementa hasta, hasta aproximadamente, o hasta 290 ml/día cuando la densidad o concentración de las células alcanza una concentración de, de aproximadamente, o de al menos 0,61 x 10<sup>6</sup> células/ml. En determinados casos, las células se perfunden a una tasa de, de aproximadamente, o al menos 290 ml/día cuando la densidad o concentración de las células alcanza una concentración de, de aproximadamente, o



de al menos  $0,61 \times 10^6$  células/ml cuando las células se cultivan a un volumen de, de aproximadamente, o al menos 1000 ml. En algunos casos, la tasa de perfusión aumenta hasta, hasta aproximadamente, o hasta 580 ml/día cuando la densidad o concentración de las células alcanza una concentración de, de aproximadamente, o de al menos  $0,81 \times 10^6$  células/ml. En determinados casos, la tasa de perfusión aumenta hasta, hasta aproximadamente, o hasta 1160 ml/día cuando la densidad o concentración de las células alcanza una concentración de, de aproximadamente, o de al menos  $1,01 \times 10^6$  células/ml. En algunos casos, la tasa de perfusión aumenta hasta, hasta aproximadamente, o hasta 1160 ml/día cuando la densidad o concentración de las células alcanza una concentración de, de aproximadamente, o de al menos  $1,2 \times 10^6$  células/ml.

En casos de los casos divulgados, la tasa de perfusión, incluido el momento en que se inicia o se incrementa, tal como se describe en el presente documento y anteriormente, se determina evaluando la densidad y/o concentración de las células o evaluando la densidad y/o concentración de células viables durante el cultivo. En algunos casos, la densidad y/o concentración de las células puede determinarse utilizando métodos como los descritos, incluidos los métodos ópticos, incluida la microscopía de holografía digital (DHM) o la microscopía de holografía digital diferencial (DDHM).

En algunos casos, una composición de células enriquecidas, tal como linfocitos T modificados genéticamente, p. ej., linfocitos T CD4+ modificados genéticamente o linfocitos T CD8+ modificados genéticamente, se cultiva en presencia de un tensioactivo. En casos particulares, cultivar las células de la composición reduce la cantidad de tensión de cizallamiento que puede producirse durante el cultivo, p. ej., debido a la mezcla, balanceo, movimiento y/o perfusión. En casos particulares, la composición de linfocitos T enriquecidos, tal como linfocitos T modificados genéticamente, p. ej., linfocitos T CD4+ modificados genéticamente o linfocitos T CD8+ modificados genéticamente, se cultiva con el tensioactivo y al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 %, o al menos un 99,9 % de los linfocitos T sobreviven, p. ej., son viables y/o no sufren necrosis, muerte celular programada, o apoptosis, durante o al menos 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, o más de 7 días después de finalizado el cultivo. En casos particulares, la composición de linfocitos T enriquecidos, tal como linfocitos T modificados genéticamente, p. ej., linfocitos T CD4+ modificados genéticamente o linfocitos T CD8+ modificados genéticamente, se cultiva en presencia de un tensioactivo y menos del 50 %, menos del 40 %, menos del 30 %, menos del 25 %, menos del 20 %, menos del 15 %, menos del 10 %, menos del 5 %, menos del 1 %, menos del 0,1 % o menos del 0,01 % de las células sufren muerte celular, p. ej., muerte celular programada, apoptosis y/o necrosis, por ejemplo, debido al cizallamiento o a la tensión inducida por el cizallamiento.

En casos particulares, una composición de linfocitos T enriquecidos, tal como linfocitos T modificados genéticamente, p. ej., linfocitos T CD4+ modificados genéticamente o linfocitos T CD8+ modificados genéticamente, se cultiva en presencia de entre 0,1  $\mu$ l/ml y 10,0  $\mu$ l/ml, entre 0,2  $\mu$ l/ml y 2,5  $\mu$ l/ml, entre 0,5  $\mu$ l/ml y 5  $\mu$ l/ml, entre 1  $\mu$ l/ml y 3  $\mu$ l/ml, o entre 2  $\mu$ l/ml y 4  $\mu$ l/ml del tensioactivo. En algunos casos, la composición de linfocitos T enriquecidos, tal como linfocitos T modificados genéticamente, p. ej., linfocitos T CD4+ modificados genéticamente o linfocitos T CD8+ modificados genéticamente, se cultiva en presencia de, de aproximadamente, o al menos 0,1  $\mu$ l/ml, 0,2  $\mu$ l/ml, 0,4  $\mu$ l/ml, 0,6  $\mu$ l/ml, 0,8  $\mu$ l/ml, 1  $\mu$ l/ml, 1,5  $\mu$ l/ml, 2,0  $\mu$ l/ml, 2,5  $\mu$ l/ml, 5,0  $\mu$ l/ml, 10  $\mu$ l/ml, 25  $\mu$ l/ml, o 50  $\mu$ l/ml del tensioactivo. En determinados casos, la composición de linfocitos T enriquecidos se cultiva en presencia de o de aproximadamente 2  $\mu$ l/ml del tensioactivo.

En algunos casos, un tensioactivo es o incluye un agente que reduce la tensión superficial de líquidos y/o sólidos. Por ejemplo, un tensioactivo incluye un alcohol graso (p. ej., alcohol estearílico), un polioxietilenglicol octilfenol éter (p. ej., Triton X-100), o un polioxietilenglicol sorbitán alquil éster (p. ej., polisorbato 20, 40, 60). En determinados casos, el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 80 (PS80), polisorbato 20 (PS20), poloxámero 188 (P188). En un caso de ejemplo, la concentración del tensioactivo en los medios de alimentación químicamente definidos es de aproximadamente 0,0025 % a aproximadamente 0,25 % (v/v) de PS80; de aproximadamente 0,0025 % a aproximadamente 0,25 % (v/v) de PS20; o de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 5,0 % (p/v) de P188.

En algunos casos, el tensioactivo es o incluye un tensioactivo aniónico, un tensioactivo catiónico, un tensioactivo zwitteriónico, o un tensioactivo no iónico añadido al mismo. Los tensioactivos aniónicos adecuados incluyen, pero sin limitación, alquil sulfonatos, alquil fosfatos, alquil fosfonatos, laurato de potasio, estearato de trietanolamina, laurilsulfato de sodio, dodecilsulfato de sodio, sulfatos de alquilpolioxietileno, alginato de sodio, dioctil sulfosuccinato de sodio, fosfatidilglicerol, fosfatidilinosina, fosfatidilinositol, difosfatidilglicerol, fosfatidilserina, ácido fosfatídico y sus sales, carboximetilcelulosa de sodio, ácido cólico y otros ácidos biliares (p. ej., ácido cólico, ácido desoxicólico, ácido glicocólico, ácido taurocólico, ácido glicodesoxicólico) y sus sales (p. ej., desoxicolato de sodio).

En algunos casos, los tensioactivos no iónicos adecuados incluyen: ésteres de glicerilo, éteres de alcohol graso de polioxietileno, ésteres de ácidos grasos de polioxietileno sorbitán (polisorbatos), ésteres de ácido graso de polioxietileno, ésteres de sorbitán, monoestearato de glicerol, polietilenglicoles, polipropilenglicoles, alcohol cetílico, alcohol cetosteárico, alcohol estearílico, alcoholes aril alquil poliéter, copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno (poloxámeros), poloxaminas, metilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, celulosa no cristalina, polisacáridos, incluido el almidón y derivados del almidón, tal como el hidroxietilalmidón (HES), alcohol polivinílico y polivinilpirrolidona. En determinados casos, el tensioactivo no iónico es un copolímero de polioxietileno y polioxipropileno y, preferentemente, un copolímero de bloques de propilenglicol y etilenglicol. Estos

polímeros se comercializan con el nombre comercial de POLOXAMER, también denominado en ocasiones PLURONIC® F68 o Kolliphor® P188. Entre los ésteres polioxi-etilénicos de ácidos grasos se incluyen los que tienen cadenas alquílicas cortas. Un ejemplo de dicho tensioactivo es Solutol® HS 15, polietileno-660-hidroxiestearato.

- 5 En algunos casos, los tensioactivos catiónicos adecuados pueden incluir, pero no se limitan a, fosfolípidos naturales, fosfolípidos sintéticos, compuestos de amonio cuaternario, cloruro de benzalconio, bromuro de cetiltrimetilamonio, quitosanos, cloruro de lauril dimetil bencil amonio, clorhidratos de acilcarnitina, bromuro de dimetil dioctadecil amonio (DDAB), dioleoiltrimetil amonio propano (DOTAP), dimiristoil trimetil amonio propano (DMTAP), dimetil amino etano carbamoil colesterol (DC-Chol), 1,2-diacilglicero-3-(O-alquil) fosfocolina, O-alquilfosfatidilcolina, haluros de alquilpiridinio, o aminas de alquilo de cadena larga tales como, por ejemplo, n-octilamina y oleilamina.

- 10 Los tensioactivos zwitteriónicos son eléctricamente neutros pero poseen cargas locales positivas y negativas dentro de la misma molécula. Los tensioactivos zwitteriónicos adecuados incluyen, pero sin limitación, los fosfolípidos zwitteriónicos. Los fosfolípidos adecuados incluyen la fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, diacil-glicero-fosfoetanolamina (tal como la dimiristoil-glicero-fosfoetanolamina (DMPE), dipalmitoil-glicero-fosfoetanolamina (DPPE), distearoil-glicero-fosfoetanolamina (DSPE), y dioleoil-glicero-fosfoetanolamina (DOPE)). En esta invención pueden emplearse mezclas de fosfolípidos que incluyen fosfolípidos aniónicos y zwitteriónicos. Dichas mezclas incluyen, pero sin limitación, lisofosfolípidos, fosfolípido de huevo o de soja o cualquier combinación de los mismos. El fosfolípido, independientemente de si es aniónico, zwitteriónico o una mezcla de fosfolípidos, puede ser salado o
- 15 desalado, hidrogenado o parcialmente hidrogenado o natural, semisintético o sintético.

- 20 En determinados casos, el tensioactivo es poloxámero, p. ej., poloxámero 188. En algunos casos, una composición de linfocitos T enriquecidos se cultiva en presencia de entre 0,1  $\mu\text{l/ml}$  y 10,0  $\mu\text{l/ml}$ , entre 0,2  $\mu\text{l/ml}$  y 2,5  $\mu\text{l/ml}$ , entre 0,5  $\mu\text{l/ml}$  y 5  $\mu\text{l/ml}$ , entre 1  $\mu\text{l/ml}$  y 3  $\mu\text{l/ml}$ , o entre 2  $\mu\text{l/ml}$  y 4  $\mu\text{l/ml}$  de poloxámero. En algunos casos, la composición de linfocitos T enriquecidos se cultiva en presencia de, de aproximadamente, o al menos 0,1  $\mu\text{l/ml}$ , 0,2  $\mu\text{l/ml}$ , 0,4  $\mu\text{l/ml}$ , 0,6  $\mu\text{l/ml}$ , 0,8  $\mu\text{l/ml}$ , 1  $\mu\text{l/ml}$ , 1,5  $\mu\text{l/ml}$ , 2,0  $\mu\text{l/ml}$ , 2,5  $\mu\text{l/ml}$ , 5,0  $\mu\text{l/ml}$ , 10  $\mu\text{l/ml}$ , 25  $\mu\text{l/ml}$ , o 50  $\mu\text{l/ml}$  del tensioactivo. En determinados casos, la composición de linfocitos T enriquecidos se cultiva en presencia de o de aproximadamente 2  $\mu\text{l/ml}$  de poloxámero.

- 30 En casos particulares, el cultivo finaliza, tal como mediante la cosecha de células, cuando las células alcanzan una cantidad, concentración y/o expansión umbral. En casos particulares, el cultivo finaliza cuando la célula alcanza o alcanza aproximadamente o al menos una expansión de 1,5 veces, una expansión de 2 veces, una expansión de 2,5 veces, una expansión de 3 veces, una expansión de 3,5 veces, una expansión de 4 veces, una expansión de 4,5 veces, una expansión de 5 veces, una expansión de 6 veces, una expansión de 7 veces, una expansión de 8 veces,
- 35 una expansión de 9 veces, una expansión de 10 veces, o superior a una expansión de 10 veces, p. ej., con respecto y/o con relación a la cantidad de densidad de las células al inicio o comienzo del cultivo. En algunos casos, la expansión umbral es una expansión de 4 veces, p. ej., con respecto y/o con relación a la cantidad de densidad de las células al inicio o comienzo del cultivo.

- 40 En algunos casos, el cultivo finaliza, tal como mediante la cosecha de células, cuando las células alcanzan un umbral de cantidad total de células, p. ej., umbral de recuento de células. En algunos casos, el cultivo finaliza cuando las células alcanzan un recuento umbral de células nucleadas totales (CNT). En algunos casos, el cultivo finaliza cuando las células alcanzan una cantidad umbral de células viables, p. ej., umbral de recuento de células viables. En algunos casos, el recuento de células umbral es o es de aproximadamente o es de al menos  $50 \times 10^6$  células,  $100 \times 10^6$  células,
- 45  $200 \times 10^6$  células,  $300 \times 10^6$  células,  $400 \times 10^6$  células,  $600 \times 10^6$  células,  $800 \times 10^6$  células,  $1000 \times 10^6$  células,  $1200 \times 10^6$  células,  $1400 \times 10^6$  células,  $1600 \times 10^6$  células,  $1800 \times 10^6$  células,  $2000 \times 10^6$  células,  $2500 \times 10^6$  células,  $3000 \times 10^6$  células,  $4000 \times 10^6$  células,  $5000 \times 10^6$  células,  $10.000 \times 10^6$  células,  $12.000 \times 10^6$  células,  $15.000 \times 10^6$  células o  $20.000 \times 10^6$  células, o cualquiera de los umbrales anteriores de células viables. En casos particulares, el cultivo finaliza cuando las células alcanzan un recuento de células umbral. En algunos casos, el cultivo finaliza en, en aproximadamente, o en un plazo de 6 horas, 12 horas, 24 horas, 36 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o 7 o más días, una vez alcanzado el umbral de recuento de células. En casos particulares, el cultivo finaliza 1 día o aproximadamente 1 día después de alcanzar el recuento de células umbral. En determinados casos, la densidad umbral es, es aproximadamente, o es al menos  $0,1 \times 10^6$  células/ml,  $0,5 \times 10^6$  células/ml,  $1 \times 10^6$  células/ml,  $1,2 \times 10^6$  células/ml,  $1,5 \times 10^6$  células/ml,  $1,6 \times 10^6$  células/ml,  $1,8 \times 10^6$  células/ml,  $2,0 \times 10^6$  células/ml,  $2,5 \times 10^6$  células/ml,  $3,0 \times 10^6$  células/ml,  $3,5 \times 10^6$  células/ml,  $4,0 \times 10^6$  células/ml,  $4,5 \times 10^6$  células/ml,  $5,0 \times 10^6$  células/ml,  $6 \times 10^6$  células/ml,  $8 \times 10^6$  células/ml, o  $10 \times 10^6$  células/ml, o cualquiera de los umbrales anteriores de células viables. En casos particulares, el cultivo finaliza cuando las células alcanzan una densidad umbral. En algunos casos, el cultivo finaliza en, en aproximadamente, o en un plazo de 6 horas, 12 horas, 24 horas, 36 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o 7 o más días, una vez alcanzado el umbral de densidad. En casos particulares, el cultivo finaliza 1 día después o aproximadamente 1 día después de alcanzar la densidad umbral.
- 50
- 55
- 60

- En algunos casos, la etapa de cultivo se realiza durante el tiempo requerido para que las células alcancen una cantidad, densidad y/o expansión umbral. En algunos casos, el cultivo se realiza durante o durante aproximadamente, o durante menos de, 6 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 60 horas, 72 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas o 4 semanas. En casos particulares, la media de tiempo requerido para que las células de una pluralidad de composiciones separadas de
- 65

- linfocitos T enriquecidos que fueron aislados, enriquecidos y/o seleccionados a partir de diferentes muestras biológicas alcancen la densidad umbral es, es aproximadamente o es menos de 6 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 60 horas, 72 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas o 4 semanas. En determinados casos, la media de tiempo requerido para que las células de una pluralidad de composiciones separadas de linfocitos T enriquecidos que fueron aislados, enriquecidos y/o seleccionados a partir de diferentes muestras biológicas alcancen la densidad umbral es, es aproximadamente o es menos de 6 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 60 horas, 72 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas o 4 semanas.
- En determinados casos, la etapa de cultivo se realiza durante un mínimo de 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 7 días, 8 días, 9 días, o 10 días, y/o hasta 12 horas, 24 horas, 36 horas, 1 día, 2 días, o 3 días después de que las células activen un recuento (o número) de células umbral o un recuento (o número) de células viables umbral de o de aproximadamente  $1000 \times 10^6$  células,  $1200 \times 10^6$  células,  $1400 \times 10^6$  células,  $1600 \times 10^6$  células,  $1800 \times 10^6$  células,  $2000 \times 10^6$  células,  $2500 \times 10^6$  células,  $3000 \times 10^6$  células,  $4000 \times 10^6$  células, o  $5000 \times 10^6$  células. En algunos casos, la etapa de cultivo se realiza hasta 1 día después de que las células alcancen un recuento de células umbral de o de aproximadamente  $1200 \times 10^6$  células y se cultiven durante un mínimo de 10 días, y/o hasta 1 día después de que las células alcancen un recuento de células umbral de o de aproximadamente  $5000 \times 10^6$  células. En algunos casos, la etapa de cultivo se realiza hasta 1 día después de que las células alcancen un recuento de células umbral de o de aproximadamente  $1200 \times 10^6$  células y se cultiven durante un mínimo de 9 días, y/o hasta 1 día después de que las células alcancen un recuento de células umbral de o de aproximadamente  $5000 \times 10^6$  células. En algunos casos, la etapa de cultivo se realiza hasta 1 día después de que las células alcancen un recuento de células umbral de o de aproximadamente  $1000 \times 10^6$  células y se cultiven durante un mínimo de 8 días, y/o hasta 1 día después de que las células alcancen un recuento de células umbral de o de aproximadamente  $4000 \times 10^6$  células. En determinados casos, el cultivo es una etapa de expansión y se realiza durante un mínimo de 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 7 días, 8 días, 9 días, o 10 días, y/o hasta 12 horas, 24 horas, 36 horas, 1 día, 2 días, o 3 días después de que las células activen un recuento (o número) de células umbral o un recuento (o número) de células viables umbral de o de aproximadamente  $1000 \times 10^6$  células,  $1200 \times 10^6$  células,  $1400 \times 10^6$  células,  $1600 \times 10^6$  células,  $1800 \times 10^6$  células,  $2000 \times 10^6$  células,  $2500 \times 10^6$  células,  $3000 \times 10^6$  células,  $4000 \times 10^6$  células, o  $5000 \times 10^6$  células. En algunos casos, la etapa de expansión se realiza hasta 1 día después de que las células alcancen un recuento de células umbral de o de aproximadamente  $1200 \times 10^6$  células y se expandan durante un mínimo de 10 días, y/o hasta 1 día después de que las células alcancen un recuento de células umbral de o de aproximadamente  $5000 \times 10^6$  células. En algunos casos, la etapa de expansión se realiza hasta 1 día después de que las células alcancen un recuento de células umbral de o de aproximadamente  $1200 \times 10^6$  células y se expandan durante un mínimo de 9 días, y/o hasta 1 día después de que las células alcancen un recuento de células umbral de o de aproximadamente  $5000 \times 10^6$  células. En algunos casos, la etapa de expansión se realiza hasta 1 día después de que las células alcancen un recuento de células umbral de o de aproximadamente  $1000 \times 10^6$  células y se expandan durante un mínimo de 8 días, y/o hasta 1 día después de que las células alcancen un recuento de células umbral de o de aproximadamente  $4000 \times 10^6$  células. En algunos casos, la etapa de expansión se realiza hasta 1 día después de que las células alcancen un recuento de células umbral de o de aproximadamente  $1400 \times 10^6$  células y se expandan durante un mínimo de 5 días, y/o hasta 1 día después de que las células alcancen un recuento de células umbral de o de aproximadamente  $4000 \times 10^6$  células.
- En algunos casos, el cultivo se realiza durante al menos un tiempo mínimo. En algunos casos, el cultivo se realiza durante al menos 14 días, al menos 12 días, al menos 10 días, al menos 7 días, al menos 6 días, al menos 5 días, al menos 4 días, al menos 3 días, al menos 2 días, al menos 36 horas, al menos 24 horas, al menos 12 horas o al menos 6 horas, incluso si el umbral se alcanza antes del tiempo mínimo. En algunos casos, aumentar el tiempo mínimo de realización del cultivo, puede, en algunos casos, reducir la activación y/o reducir el nivel de uno o más marcadores de activación, en las células cultivadas, células formuladas, y/o células de la composición de salida. En algunos casos, el tiempo mínimo de cultivo cuenta a partir de un punto determinado de un proceso ilustrativo (p. ej., una etapa de selección; una etapa de descongelación; y/o una etapa de activación) hasta el día de la cosecha de las células.
- En casos de los casos divulgados, la densidad y/o concentración de las células o de las células viables durante el cultivo se controla o se lleva a cabo durante el cultivo, tal como hasta que se consigue una cantidad, densidad, y/o expansión umbral como se ha descrito. En algunos casos, dichos métodos incluyen los descritos, incluidos los métodos ópticos, incluida la microscopía de holografía digital (DHM) o la microscopía de holografía digital diferencial (DDHM).
- En determinados casos, las células cultivadas son células de salida. En algunos casos, una composición de linfocitos T enriquecidos, tal como linfocitos T modificados genéticamente, que se han cultivado es una composición de linfocitos T enriquecidos de salida. En casos particulares, los linfocitos T CD4+ y/o CD8+ que han sido cultivados son linfocitos T CD4+ y/o CD8+ de salida. En casos particulares, una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos, tales como los linfocitos T CD4+ modificados genéticamente, que se han cultivado es una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos de salida. En algunos casos, una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos, tales como los linfocitos T CD8+ modificados genéticamente, que se han cultivado es una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos de salida.
- En algunos casos, las células se cultivan en condiciones que promueven la proliferación y/o expansión en presencia de una o más citocinas. En casos particulares, al menos una parte del cultivo se realiza con mezcla y/o perfusión

constantes, tal como la mezcla o la perfusión controlada por un biorreactor. En algunos casos, las células se cultivan en presencia de una o más citocinas y con un agente tensioactivo, p. ej., poloxámero, tal como poloxámero 188, para reducir el cizallamiento y/o la tensión de cizallamiento debidos a la mezcla y/o perfusión constantes. En algunos casos, una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos, tales como los linfocitos T CD4+ modificados genéticamente, se cultiva en presencia de IL-2, IL-7, IL-15 recombinantes y poloxámero, en donde al menos una parte del cultivo se realiza con mezcla y/o perfusión constantes. En determinados casos, una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos, tales como los linfocitos T CD8+ modificados genéticamente, se cultiva en presencia de IL-2, IL-15 recombinante y poloxámero, en donde al menos una parte del cultivo se realiza con mezcla y/o perfusión constantes. En algunos casos, el cultivo se realiza hasta que las células alcanzan un umbral de expansión de al menos 4 veces, p. ej., en comparación con el inicio del cultivo.

#### *Control de las células durante el cultivo*

En algunos casos, las células se controlan durante la etapa de cultivo. Puede realizarse una monitorización, por ejemplo, para comprobar (p. ej., medir, cuantificar) la morfología celular, la viabilidad celular, la muerte celular, y/o la concentración celular (p. ej., concentración de células viables). En algunos casos, la monitorización se realiza manualmente, tal como por un operador humano. En algunos casos, la monitorización lo realiza un sistema automatizado. El sistema automatizado puede requerir una intervención manual mínima o nula para monitorizar las células cultivadas. En algunos casos, la monitorización se realiza tanto manualmente como mediante un sistema automatizado.

En determinados casos, las células son controladas por un sistema automatizado que no requiere ninguna intervención manual. En algunos casos, el sistema automatizado es compatible con un biorreactor, por ejemplo, un biorreactor como se describe en el presente documento, de forma que las células en cultivo puedan extraerse del biorreactor, controlarse y posteriormente ser devueltas al biorreactor. En algunos casos, la monitorización y el cultivo se producen en una configuración de bucle cerrado. En algunos casos, en una configuración de bucle cerrado, el sistema automatizado y el biorreactor permanecen estériles. En unos casos, el sistema automatizado es estéril. En algunos casos, el sistema automatizado es un sistema en línea.

En algunos casos, el sistema automatizado incluye el uso de técnicas ópticas (p. ej., microscopía) para detectar la morfología celular, la viabilidad celular, la muerte celular, y/o la concentración celular (p. ej., concentración de células viables). Cualquier técnica óptica adecuada para determinar, por ejemplo, rasgos distintivos, viabilidad y concentración de las células. Ejemplos no limitativos de técnicas ópticas útiles incluyen la microscopía de campo claro, microscopía de fluorescencia, microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC), microscopía de contraste de fases, microscopía de holografía digital (DHM), microscopía de holografía digital diferencial (DDHM), o una combinación de las mismas. La microscopía de holografía digital diferencial, DDHM y DHM diferencial pueden utilizarse en el presente documento indistintamente. En determinados casos, el sistema automatizado incluye un microscopio de holografía digital diferencial. En determinados casos, el sistema automatizado incluye un microscopio de holografía digital diferencial que incluye medios de iluminación (p. ej., láser, led). Se pueden encontrar descripciones de la metodología y el uso de DDHM, por ejemplo, en los documentos US 7362449; EP 1,631,788; US 9,904,248; y US 9.684.281.

La DDHM permite la obtención de imágenes sin marcadores, no destructiva de las células, dando lugar a imágenes holográficas de alto contraste. Las imágenes pueden someterse a una segmentación de objetos y a un análisis posterior para obtener una pluralidad de rasgos distintivos morfológicos que describan cuantitativamente los objetos de las imágenes (p. ej., células cultivadas, restos celulares). Como tal, varios rasgos distintivos (p. ej., morfología celular, viabilidad celular, concentración celular) pueden evaluarse directamente o calcularse a partir de la DDHM utilizando, por ejemplo, las etapas de adquisición de imágenes, procesamiento de imágenes, segmentación de imágenes y extracción de rasgos distintivos. En algunos casos, el sistema automatizado incluye un dispositivo de grabación digital para grabar imágenes holográficas. En algunos casos, el sistema automatizado incluye un ordenador con algoritmos para analizar imágenes holográficas. En algunos casos, el sistema automatizado incluye un monitor y/o un ordenador para visualizar los resultados del análisis de la imagen holográfica. En algunos casos, el análisis es automatizado (es decir, capaz de realizarse sin intervención del usuario). Un ejemplo de sistema automatizado adecuado para monitorizar las células durante la etapa de cultivo incluye, aunque no de forma limitativa, Ovizio iLine F (Ovizio Imaging Systems NV/SA, Bruselas, Bélgica).

En determinados casos, la monitorización se realiza de forma continua durante la etapa de cultivo. En algunos casos, la monitorización se realiza en tiempo real durante la etapa de cultivo. En algunos casos, la monitorización se realiza en momentos concretos durante la etapa de cultivo. En algunos casos, la monitorización se realiza al menos cada 15 minutos durante la etapa de cultivo. En algunos casos, la monitorización se realiza al menos cada 30 minutos durante la etapa de cultivo. En algunos casos, la monitorización se realiza al menos cada 45 minutos durante la etapa de cultivo. En algunos casos, la monitorización se realiza al menos cada hora durante la etapa de cultivo. En algunos casos, la monitorización se realiza al menos cada 2 horas durante la etapa de cultivo. En algunos casos, la monitorización se realiza al menos cada 4 horas durante la etapa de cultivo. En algunos casos, la monitorización se realiza al menos cada 6 horas durante la etapa de cultivo. En algunos casos, la monitorización se realiza al menos cada 8 horas durante la etapa de cultivo. En algunos casos, la monitorización se realiza al menos cada 10 horas durante la etapa de cultivo. En algunos casos, la monitorización se realiza al menos cada 12 horas durante la etapa

de cultivo. En algunos casos, la monitorización se realiza al menos cada 14 horas durante la etapa de cultivo. En algunos casos, la monitorización se realiza al menos cada 16 horas durante la etapa de cultivo. En algunos casos, la monitorización se realiza al menos cada 18 horas durante la etapa de cultivo. En algunos casos, la monitorización se realiza al menos cada 20 horas durante la etapa de cultivo. En algunos casos, la monitorización se realiza al menos cada 22 horas durante la etapa de cultivo. En algunos casos, la monitorización se realiza al menos una vez al día durante toda la etapa de cultivo. En algunos casos, la monitorización se realiza al menos una vez cada dos días durante toda la etapa de cultivo. En algunos casos, la monitorización se realiza al menos una vez cada tres días durante toda la etapa de cultivo. En algunos casos, la monitorización se realiza al menos una vez cada cuatro días durante toda la etapa de cultivo. En algunos casos, la monitorización se realiza al menos una vez cada cinco días durante toda la etapa de cultivo. En algunos casos, la monitorización se realiza al menos una vez cada seis días durante toda la etapa de cultivo. En algunos casos, la monitorización se realiza al menos una vez cada siete días durante toda la etapa de cultivo. En algunos casos, la monitorización se realiza al menos una vez cada ocho días durante toda la etapa de cultivo. En algunos casos, la monitorización se realiza al menos una vez cada nueve días durante toda la etapa de cultivo. En algunos casos, la monitorización se realiza al menos una vez cada diez días durante toda la etapa de cultivo. En algunos casos, la monitorización se realiza al menos una vez durante la etapa de cultivo.

En algunos casos, rasgos distintivos de las células que pueden determinarse mediante la monitorización, incluyendo el uso de técnicas ópticas como DHM o DDHM, incluyen la viabilidad celular, concentración celular, número de células y/o densidad celular. En algunos casos, se caracteriza o determina la viabilidad celular. En algunos casos, se caracteriza o determina la concentración, densidad y/o el número de células. En algunos casos, se caracteriza o determina la concentración de células viables, el número de células viables y/o la densidad de células viables. En algunos casos, las células cultivadas son controladas por el sistema automatizado hasta que se alcanza un umbral de expansión, tal como se ha descrito anteriormente. En algunos casos, una vez alcanzado un umbral de expansión, se cosechan las células cultivadas, mediante métodos automáticos o manuales, por ejemplo, por un operador humano. El umbral de expansión puede depender de la concentración total, densidad y/o número de células cultivadas determinados por el sistema automatizado. De manera alternativa, el umbral de expansión puede depender de la concentración, densidad y/o número de células viables.

En algunos casos, las células cosechadas se formulan como se ha descrito, tal como en presencia de un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunos casos, las células cosechadas se formulan en presencia de un crioprotector.

### E. Formulación de las células

En algunos casos, los métodos divulgados para fabricar, generar o producir una terapia celular y/o células modificadas genéticamente puede incluir la formulación de células, tal como la formulación de células modificadas genéticamente resultantes de las etapas de procesamiento divulgadas antes o después de la incubación, modificación genética, y cultivo, y/o una o más etapas de procesamiento como se ha descrito. En algunos casos, los métodos divulgados asociados a la formulación de células incluyen el procesamiento de células transducidas, tales como las células transducidas y/o expandidas usando las etapas de procesamiento descritas anteriormente, en un sistema cerrado. En algunos casos, la dosis de células que comprenden células modificadas genéticamente con un receptor de antígeno recombinante, p. ej., CAR o TCR, se suministra en forma de composición o formulación, tal como una composición o formulación farmacéutica. Dichas composiciones pueden utilizarse de acuerdo con los métodos divulgados, tales como en la prevención o tratamiento de enfermedades, afecciones y trastornos, o en los métodos de detección, diagnóstico y pronóstico.

En algunos casos, el procesamiento de las células en una o más etapas (p. ej., llevadas a cabo en la cámara centrífuga y/o en el sistema cerrado) para fabricar, generar o producir una terapia celular y/o células modificadas genéticamente puede incluir la formulación de células, tal como la formulación de células modificadas genéticamente resultantes de las etapas de procesamiento de transducción divulgadas antes o después del cultivo, p. ej., el cultivo y la expansión, y/o una o más de otras etapas de transformación, tal como se han descrito. En algunos casos, las células pueden formularse en una cantidad para administración dosificada, tal como para la administración de una dosis unitaria o de dosis múltiples. En algunos casos, los métodos divulgados asociados a la formulación de células incluyen el procesamiento de células transducidas, tales como las células transducidas y/o expandidas usando las etapas de procesamiento descritas anteriormente, en un sistema cerrado.

En determinados casos, se formulan una o más composiciones de linfocitos T enriquecidos, tales como los linfocitos T modificados genéticamente y cultivados, p. ej., linfocitos T de salida. En casos particulares, una o más composiciones de linfocitos T enriquecidos, tales como los linfocitos T modificados genéticamente y cultivados, p. ej., linfocitos T de salida, se formulan después de que la una o más composiciones hayan sido modificadas genéticamente y/o cultivadas. En casos particulares, la una o más composiciones son composiciones de entrada. En algunos casos, la una o más composiciones de entrada han sido previamente criop congeladas y almacenadas, y se descongelan antes de la incubación.

En determinados casos, la una o más composiciones de linfocitos T enriquecidos, tales como los linfocitos T modificados genéticamente y cultivados, p. ej., linfocitos T de salida, son o incluyen dos composiciones separadas,

p. ej., composiciones modificadas genéticamente y/o cultivadas de linfocitos T enriquecidos separadas. En casos particulares, dos composiciones de linfocitos T enriquecidos separadas, p. ej., dos composiciones de linfocitos T CD4+ enriquecidos y linfocitos T CD8+ separadas, aisladas y/o enriquecidas a partir de la misma muestra biológica, modificadas genéticamente y cultivadas por separado, se formulan por separado. En determinados casos, las dos composiciones separadas incluyen una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos, tal como una composición de linfocitos T CD4+ modificados genéticamente y/o cultivados. En casos particulares, las dos composiciones separadas incluyen una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos, tal como una composición de linfocitos T CD8+ modificados genéticamente y/o cultivados. En algunos casos, dos composiciones de linfocitos T CD4+ enriquecidos y linfocitos T CD8+ enriquecidos separadas, tales como composiciones de linfocitos T CD4+ modificados genéticamente y cultivados y linfocitos T CD8+ modificados genéticamente y cultivados separadas, se formulan por separado. En algunos casos, se formula una composición única de linfocitos T enriquecidos. En determinados casos, la composición única es una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos, tal como una composición de linfocitos T CD4+ modificados genéticamente y/o cultivados. En algunos casos, la composición única es una composición de linfocitos T CD4+ y CD8+ enriquecidos que se han combinado a partir de composiciones separadas antes de la formulación.

En algunos casos, las composiciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ enriquecidos separadas, tal como composiciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ modificados genéticamente y cultivados, se combinan en una única composición y se formulan. En determinados casos, las composiciones formuladas de linfocitos T CD4+ enriquecidos y CD8+ enriquecidos separadas se combinan en una única composición una vez realizada y/o completada la formulación. En casos particulares, las composiciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ enriquecidos separadas, tal como composiciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ modificados genéticamente y cultivados, se formulan por separado como composiciones independientes.

En algunos casos, la composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos, tal como linfocitos T CD4+ modificados genéticamente y cultivados, p. ej., linfocitos T CD4+ de salida, que se formula, incluye al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 %, al menos un 99,9 %, o un o aproximadamente un 100 % de linfocitos T CD4+. En algunos casos, la composición incluye al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 %, al menos un 99,9 %, o un o aproximadamente un 100 % de linfocitos T CD4+ que expresan un receptor recombinante y/o han sido transducidos o transfectados con el polinucleótido recombinante. En determinados casos, la composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos, tal como linfocitos T CD4+ modificados genéticamente y cultivados, p. ej., linfocitos T CD4+ de salida, que se formula incluye menos del 40 %, menos del 35 %, menos del 30 %, menos del 25 %, menos del 20 %, menos del 15 %, menos del 10 %, menos del 5 %, menos del 1 %, menos del 0,1 %, o menos del 0,01 % de linfocitos T CD8+, y/o no contiene linfocitos T CD8+, y/o está exenta o sustancialmente exenta de linfocitos T CD8+.

En algunos casos, la composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos, tal como linfocitos T CD8+ modificados genéticamente y cultivados, p. ej., linfocitos T CD8+ de salida, que se formula, incluye al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 %, al menos un 99,9 %, o un o aproximadamente un 100 % de linfocitos T CD8+. En determinados casos, la composición incluye al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 %, al menos un 99,9 %, o un o aproximadamente un 100 % de linfocitos T CD8+ que expresan el receptor recombinante y/o han sido transducidos o transfectados con el polinucleótido recombinante. En determinados casos, la composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos, tal como linfocitos T CD8+ modificados genéticamente y cultivados, p. ej., linfocitos T CD8+ de salida, que se incuba en condiciones de estimulación incluye menos del 40 %, menos del 35 %, menos del 30 %, menos del 25 %, menos del 20 %, menos del 15 %, menos del 10 %, menos del 5 %, menos del 1 %, menos del 0,1 %, o menos del 0,01 % de linfocitos T CD4+, y/o no contiene linfocitos T CD4+, y/o está exenta o sustancialmente exenta de linfocitos T CD4+.

En determinados casos, las células formuladas son células de salida. En algunos casos, una composición formulada de linfocitos T enriquecidos, tal como una composición formulada de linfocitos T modificados genéticamente y cultivados, es una composición de linfocitos T enriquecidos de salida. En casos particulares, los linfocitos T CD4+ formulados y/o los linfocitos T CD8+ formulados son los linfocitos T CD4+ y/o CD8+ de salida. En casos particulares, una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos formulados es una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos de salida. En algunos casos, una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos formulados es una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos de salida.

En algunos casos, las células pueden formularse en un recipiente, tal como una bolsa o un vial. En algunos casos, las células se formulan entre 0 días y 10 días, entre 0 y 5 días, entre 2 días y 7 días, entre 0,5 días, y 4 días, o entre 1 día y 3 días después de que las células hayan alcanzado el recuento de células, densidad y/o expansión umbral durante el cultivo. En determinados casos, las células se formulan a las o aproximadamente las o en el plazo de 12 horas, 18 horas, 24 horas, 1 día, 2 días, o 3 días después de que se haya alcanzado el recuento de células, densidad y/o expansión umbral durante el cultivo. En algunos casos, las células se formulan en el plazo de 1 día, aproximadamente, después de que se haya alcanzado el recuento de células, densidad y/o expansión umbral durante el cultivo.

Casos particulares contemplan que las células se encuentran en un estado más activado en etapas tempranas durante el cultivo que en etapas posteriores durante el cultivo. De forma adicional, en algunos casos, puede ser deseable formular células que se encuentren en un estado menos activado que el pico de activación que se produce o puede producirse durante el cultivo. En determinados casos, las células se cultivan durante una duración o tiempo mínimos, por ejemplo, de modo que las células se recojan en un estado menos activado que si se formularan en un momento anterior del cultivo, independientemente del momento en que se alcance el umbral. En algunos casos, las células se cultivan entre 1 y 3 días después de que se haya alcanzado el recuento de células, densidad y/o expansión umbral durante el cultivo. En determinados casos, las células alcanzan el recuento de células, densidad, y/o expansión y umbral y permanecen cultivadas durante un tiempo o duración mínimos antes de la formulación. En algunos casos, las células que han alcanzado el umbral no se formulan hasta que no se han cultivado durante una duración y/o tiempo mínimos, tal como un tiempo mínimo o una duración de entre 1 y 14 días, 2 días y 7 días, o 3 días y 6 días, o un tiempo mínimo o duración del cultivo de o de aproximadamente 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días o más de 7 días. En algunos casos, el tiempo mínimo o duración del cultivo es entre 3 y 6 días.

En algunos casos, las células se formulan en un tampón farmacéuticamente aceptable, que puede, en algunos casos, incluir un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunos casos, el procesamiento incluye el intercambio de un medio en un medio o tampón de formulación que es farmacéuticamente aceptable o deseado para su administración a un sujeto. En algunos casos, las etapas de procesamiento pueden implicar el lavado de las células transducidas y/o expandidas para sustituir las células en un tampón farmacéuticamente aceptable que puede incluir uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables opcionales. Ejemplos de tales formas farmacéuticas, incluyendo vehículo o excipientes farmacéuticamente aceptables, puede ser cualquiera de los descritos a continuación con relación a formas aceptables para administrar las células y composiciones a un sujeto. La composición farmacéutica en algunos casos contiene las células en cantidades eficaces para tratar o prevenir la enfermedad o afección, tal como una cantidad terapéuticamente eficaz o profilácticamente eficaz.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, distinto del principio activo, que no es tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, aunque no de forma limitativa, un tampón, excipiente, estabilizante o conservante.

En algunos casos, la elección del vehículo viene determinada en parte por la célula y/o por el método de administración concretos. En consecuencia, existe una diversidad de formulaciones adecuadas. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede contener conservantes. Los conservantes adecuados pueden incluir, por ejemplo, metilparabeno, propilparabeno, benzoato de sodio y cloruro de benzalconio. En algunos casos, se usa una mezcla de dos o más conservantes. El conservante o las mezclas de los mismos están normalmente presentes en una cantidad de aproximadamente el 0,0001 % a aproximadamente el 2 % en peso de la composición total. Los vehículos se describen, p. ej., por Remington's Pharmaceutical Sciences 16a edición, Osol, A. Ed. (1980). Los vehículos farmacéuticamente aceptables en general son atóxicos para los destinatarios a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen, pero no se limitan a: tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquil parabenos, tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos metálicos (p. ej., complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, tales como polietilenglicol (PEG).

Los agentes tampón en algunos casos se incluyen en las composiciones. Los agentes tampón adecuados incluyen, por ejemplo, ácido cítrico, citrato de sodio, ácido fosfórico, fosfato de potasio y diversos otros ácidos y sales. En algunos casos, se usa una mezcla de dos o más agentes tampón. El agente tampón o mezclas del mismo están normalmente presentes en una cantidad de aproximadamente el 0,001 % a aproximadamente el 4 % en peso de la composición total. Se conocen métodos para preparar composiciones farmacéuticas administrables. Se describen métodos ilustrativos con más detalle en, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21ª ed. (1 de mayo de 2005).

Las formulaciones pueden incluir soluciones acuosas. La formulación o composición también puede contener más de un principio activo útil para la indicación particular, enfermedad o afección tratada con las células, preferentemente aquellos con actividades complementarias a las células, en donde las actividades respectivas no se afecten negativamente entre sí. Dichos principios activos están convenientemente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el fin previsto. Por lo tanto, en algunos casos, la composición farmacéutica incluye además otros agentes o fármacos farmacéuticamente activos, tales como agentes quimioterapéuticos, p. ej., asparaginasa, busulfán, carboplatino, cisplatino, daunorrubicina, doxorrubicina, fluorouracilo, gemcitabina, hidroxiurea, metotrexato, paclitaxel, rituximab, vinblastina y/o vincristina.



Las composiciones en algunos casos se proporcionan como preparaciones líquidas estériles, p. ej., soluciones acuosas isotónicas, suspensiones, emulsiones, dispersiones o composiciones viscosas, que, en algunos casos, pueden tamponarse a un pH seleccionado. Las composiciones líquidas pueden comprender vehículos, que pueden ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido) y mezclas adecuadas de los mismos. Se pueden preparar soluciones inyectables estériles incorporando las células en un disolvente, tal como en mezcla con un vehículo, diluyente o excipiente adecuados, tales como agua esterilizada, solución salina fisiológica, glucosa, dextrosa o similares. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes, dispersantes o emulsionantes (p. ej., metilcelulosa), agentes tampón del pH, aditivos gelificantes o potenciadores de la viscosidad, conservantes, aromatizantes y/o colorantes, en función de la vía de administración y la preparación deseada. En algunos casos, se pueden consultar los textos convencionales para preparar preparaciones adecuadas.

Pueden añadirse diversos aditivos que mejoran la estabilidad y la esterilidad de las composiciones, incluidos conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y tampones. Se puede garantizar la prevención de la acción de microorganismos mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol y ácido sórbico. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede conseguir por la inclusión de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

En algunos casos, el tampón de formulación contiene un crioprotector. En algunos casos, las células se formulan con una solución crioprotectora que contiene una solución de DMSO del 1,0 % al 30 %, tal como una solución de DMSO del 5 % al 20 % o una solución de DMSO del 5 % al 10 %. En algunos casos, la solución de crioprotección es o contiene, por ejemplo, PBS que contiene DMSO al 20 % y albúmina sérica humana (HSA) al 8 % u otros medios de congelación de células adecuados. En algunos casos, la solución crioprotectora es o contiene, por ejemplo, al menos o aproximadamente DMSO al 7,5 %. En algunos casos, las etapas de procesamiento pueden implicar el lavado de las células transducidas y/o expandidas para sustituir las células en una solución crioprotectora. En algunos casos, las células se congelan, p. ej., crioprotegen o crioprotegen, en medios y/o solución con una concentración final de o aproximadamente el 12,5 %, 12,0 %, 11,5 %, 11,0 %, 10,5 %, 10,0 %, 9,5 %, 9,0 %, 8,5 %, 8,0 %, 7,5 %, 7,0 %, 6,5 %, 6,0 %, 5,5 %, o 5,0 % de DMSO, o entre el 1 % y el 15 %, entre el 6 % y el 12 %, entre el 5 % y el 10 %, o entre el 6 % y el 8 % de DMSO. En casos particulares, las células se congelan, p. ej., crioprotegen o crioprotegen, en medios y/o solución con una concentración final de o aproximadamente el 5,0 %, 4,5 %, 4,0 %, 3,5 %, 3,0 %, 2,5 %, 2,0 %, 1,5 %, 1,25 %, 1,0 %, 0,75 %, 0,5 %, o 0,25 % de HSA, o entre el 0,1 % y el -5 %, entre el 0,25 % y el 4 %, entre el 0,5 % y el 2 %, o entre el 1 % y el 2 % de HSA.

En casos particulares, la composición de linfocitos T enriquecidos, p. ej., linfocitos T que han sido estimulados, modificados genéticamente y/o cultivados, se formula, crioprotege y después se conserva durante un tiempo. En determinados casos, las células crioprotegidas formuladas se conservan hasta que se liberan para infusión. En casos particulares, las células crioprotegidas formuladas se conservan entre 1 día y 6 meses, entre 1 mes y 3 meses, entre 1 día y 14 días, entre 1 día y 7 días, entre 3 días y 6 días, entre 6 meses y 12 meses, o más de 12 meses. En algunos casos, las células se crioprotegen y se conservan durante, durante aproximadamente o durante menos 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o 7 días. En determinados casos, las células se descongelan y se administran a un sujeto tras la conservación. En determinados casos, las células se conservan durante o durante aproximadamente 5 días.

En algunos casos, la formulación se lleva a cabo usando una o más etapas de procesamiento que incluyen el lavado, la dilución o la concentración de las células, tales como las células cultivadas o expandidas. En algunos casos, el procesamiento puede incluir la dilución o la concentración de las células hasta una concentración o número deseados, tales como composiciones en forma de dosis unitaria que incluyen el número de células para su administración en una dosis o fracción determinada. En algunos casos, las etapas de procesamiento pueden incluir una reducción de volumen para aumentar así la concentración de células según se desee. En algunos casos, las etapas de procesamiento pueden incluir una adición de volumen para disminuir así la concentración de células según se desee. En algunos casos, el procesamiento incluye añadir un volumen de un tampón de formulación a las células transducidas y/o expandidas. En algunos casos, el volumen del tampón de la formulación es de 10 ml a 1000 ml o de aproximadamente 10 ml a aproximadamente 1000 ml, tal como al menos o aproximadamente al menos o aproximadamente 50 ml, 100 ml, 200 ml, 300 ml, 400 ml, 500 ml, 600 ml, 700 ml, 800 ml, 900 ml o 1000 ml.

En algunos casos, tales etapas de procesamiento para formular una composición de células se llevan a cabo en un sistema cerrado. Ejemplos de estas etapas de procesamiento pueden realizarse utilizando una cámara centrífuga con relación a uno o más sistemas o kits asociados a un sistema de procesamiento celular, tal como una cámara centrífuga producida y vendida por Biosafe SA, incluidos los que se utilizan con los sistemas de procesamiento celular Sepax® o Sepax 2®. Un sistema y un proceso ilustrativos se describen en la Publicación Internacional número WO2016/073602. En algunos casos, el método incluye efectuar la expresión en la cavidad interna de la cámara centrífuga de una composición formulada, que es la composición resultante de las células formuladas en un tampón de formulación, tal como un tampón farmacéuticamente aceptable, en cualquiera de los casos como se describe. En algunos casos, la expresión de la composición formulada es en un recipiente, tales como los viales de los recipientes de material biomédico descritos en el presente documento, que está asociado operativamente como parte de un sistema cerrado con la cámara centrífuga. En algunos casos, los recipientes de material biomédico están configurados para su integración y/o conexión operable y/o están integrados o conectados de forma operable, a un sistema o dispositivo



cerrado que lleva a cabo una o más etapas de procesamiento. En algunos casos, el recipiente de material biomédico está conectado a un sistema en una línea de salida o posición de salida. En algunos casos, el sistema cerrado se conecta al vial del recipiente de material biomédico en el tubo de entrada. Entre los sistemas de cierre ilustrativos para su uso con los recipientes de material biomédico descritos en el presente documento se incluyen el sistema Sepax® y Sepax® 2.

En algunos casos, el sistema cerrado, tal como el asociado a una cámara centrífuga o a un sistema de procesamiento celular, incluye un kit de salida multipuerto que contiene un colector de tubería multidireccional asociado en cada extremo de una línea de tubería con un puerto al que pueden conectarse uno o una pluralidad de recipientes para la expresión de la composición formulada. En algunos casos, un número deseado o una pluralidad de viales, pueden conectarse estérilmente a uno o más, generalmente dos o más, tal como al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más de los puertos de la salida multipuerto. Por ejemplo, en algunos casos, uno o más recipientes, p. ej., recipientes de material biomédico, pueden estar conectados a los puertos, o a menos de todos los puertos. Por lo tanto, en algunos casos, el sistema puede efectuar la expresión de la composición de salida en una pluralidad de viales de los recipientes de material biomédico.

En algunos casos, las células pueden expresarse en uno o más de la pluralidad de recipientes de salida, p. ej., viales de los recipientes de material biomédico, en una cantidad para administración dosificada, tal como para la administración de una dosis unitaria o de dosis múltiples. Por ejemplo, en algunos casos, los viales de los recipientes de material biomédico, pueden contener cada uno el número de células para su administración en una dosis o fracción determinada. Por lo tanto, cada vial, en algunos casos, puede contener una dosis unitaria única para su administración o puede contener una fracción de una dosis deseada de tal manera que más de uno de la pluralidad de viales, tal como dos de los viales, o 3 de los viales, juntos constituyen una dosis para la administración.

Por lo tanto, los viales descritos en el presente documento, contienen generalmente las células que deben administrarse, p. ej., una o más dosis unitarias de la misma. La dosis unitaria puede ser una cantidad o número de las células que se administrarán al sujeto o el doble del número (o más) de las células que se administrarán. Puede ser la dosis más baja o la dosis más baja posible de las células que se administrarían al sujeto.

En algunos casos, cada uno de los recipientes, p. ej., bolsas de viales comprende individualmente una dosis unitaria de las células. Así, en algunos casos, cada uno de los recipientes comprende el mismo o aproximadamente o prácticamente el mismo número de alvéolos. En algunos casos, cada dosis unitaria contiene al menos o aproximadamente  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ , o  $1 \times 10^8$  células modificadas genéticamente, células totales, linfocitos T o CMSP. En algunos casos, el volumen de la composición de células formulada en cada recipiente, p. ej., bolsa o vial, es de 10 ml a 100 ml, tal como al menos o aproximadamente al menos o aproximadamente 20 ml, 30 ml, 40 ml, 50 ml, 60 ml, 70 ml, 80 ml, 90 ml o 100 ml. En algunos casos, las células del recipiente, p. ej., bolsa o viales, pueden criopreservarse. En algunos casos, el recipiente, p. ej., viales, puede conservarse en nitrógeno líquido hasta su uso posterior.

En algunos casos, dichas células producidas por el método, o una composición que comprende dichas células, se administran a un sujeto para tratar una enfermedad o afección.

#### F. Rasgos distintivos ilustrativos del proceso y/o de la composición de salida

En casos particulares, los métodos divulgados se utilizan con relación a un proceso que produce o genera una o más composiciones de linfocitos T enriquecidos de salida a partir de una o más composiciones de entrada y/o de una única muestra biológica. En determinados casos, la una o más composiciones de salida contienen células que expresan un receptor recombinante, p. ej., un TCR o un CAR. En casos particulares, las células de las composiciones de salida son adecuadas para su administración a un sujeto como terapia, p. ej., una terapia de células autólogas. En algunos casos, la una o más composiciones de salida es una composición de linfocitos T CD4+ y CD8+ enriquecidos. En determinados casos, la una o más composiciones de salida incluyen una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos. En casos particulares, la una o más composiciones de salida incluyen una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos. En algunos casos, la una o más composiciones de salida incluyen una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos de salida y una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos de salida.

En algunos casos, los métodos divulgados se utilizan con relación a un proceso completo para generar o producir células de salida y/o composiciones de linfocitos T enriquecidos de salida, tal como un proceso que incluye algunas o todas las etapas de: recoger u obtener una muestra biológica; aislar, seleccionar o enriquecer las células de entrada de la muestra biológica; criopreservar y conservar las células de entrada; descongelar y/o incubar las células de entrada en condiciones de estimulación; modificar genéticamente las células estimuladas para que expresen o contengan un polinucleótido recombinante, p. ej., un polinucleótido que codifica un receptor recombinante tal como un CAR; cultivar las células modificadas genéticamente hasta una cantidad, densidad o expansión umbral; formular las células cultivadas en una composición de salida; y/o criopreservar y conservar las células de salida formuladas hasta que las células se liberen para su infusión y/o administración a un sujeto. En algunos casos, todo el proceso se realiza con una única composición de linfocitos T enriquecidos, p. ej., linfocitos T CD4+ o linfocitos T CD4+ y CD8+. En casos particulares, todo el proceso se realiza con dos o más composiciones de linfocitos T enriquecidos, p. ej., una

composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos y una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos. En determinados casos, el proceso se realiza con dos o más composiciones de linfocitos T enriquecidos de entrada que se combinan antes y/o durante el proceso para generar o producir una única composición de linfocitos T enriquecidos de salida.

- 5 En algunos casos, al menos una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos separada y al menos una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos separada se aíslan, se seleccionan y/o enriquecen a partir de la misma muestra biológica (p. ej., el mismo producto de aféresis o leucocitaféresis que contiene CMSP autólogas) que se obtiene, recoge y/o toma del mismo sujeto, tal como un paciente o un donante sano. En un caso, la misma muestra biológica se somete primero a una selección positiva de linfocitos T CD4+, donde se retienen tanto la fracción negativa como la
- 10 positiva, y la fracción negativa se somete además a una selección positiva de linfocitos T CD8+. En otro caso, la misma muestra biológica se somete primero a una selección positiva de linfocitos T CD8+, donde se retienen tanto la fracción negativa como la positiva, y la fracción negativa se somete además a una selección positiva de linfocitos T CD4+. En algunos casos, una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos y una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos procedentes del mismo donante se congelan por separado, p. ej., se criocongelan o se crioconservan en un medio de crioconservación. En algunos casos, las composiciones de células crioconservadas por separado se conservan y/o transfieren a recipientes separados. En otros casos, las composiciones de células crioconservadas se descongelan y, opcionalmente, se lavan. En algunos casos, dos o más composiciones de linfocitos T enriquecidos separadas, siendo al menos una de ellas una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos y siendo al menos otra una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos del mismo donante, se activan y/o estimulan por separado
- 20 mediante contacto con un reactivo estimulador (p. ej., mediante incubación con perlas magnéticas conjugadas CD3/CD28 para la activación de linfocitos T), y los volúmenes de las composiciones de células enriquecidas por separado tras la activación/estimulación se ajustan opcionalmente, p. ej., reducen, para alcanzar un volumen diana. En algunos casos, las composiciones de células enriquecidas activadas/estimuladas se modifican genéticamente, se transducen y/o transfectan por separado, p. ej., utilizando el mismo vector retroviral que codifica una proteína recombinante (p. ej., CAR), para expresar la misma proteína recombinante en las composiciones de linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ separadas. En algunos casos, los volúmenes de las composiciones de células enriquecidas separadas después de la modificación genética se ajustan opcionalmente, p. ej., reducen, para alcanzar un volumen diana. En algunos casos, el método puede comprender eliminar el reactivo estimulador, p. ej., perlas magnéticas, de las composiciones separadas. En algunos casos, la composición que contiene los linfocitos T CD4+ modificados genéticamente por separado y la composición que contiene los linfocitos T CD8+ modificados genéticamente por separado se cultivan por separado, p. ej., para la expansión de la población de linfocitos T CD4+ o CD8+ en la misma. En determinados casos, las composiciones de células separadas tras el cultivo se cosechan y/o recogen y/o formulan por separado, p. ej., lavando las composiciones de células en un tampón de formulación. En determinados casos, al menos una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos formulados por separado y al menos una composición de
- 35 linfocitos T CD8+ enriquecidos formulados por separado se congelan, p. ej., se criocongelan o se crioconservan en un medio de crioconservación. En algunos casos, las formulaciones crioconservadas por separado pueden almacenarse y/o transferirse a recipientes separados. En algunos casos, al menos una formulación de linfocitos T CD4+ y al menos una formulación de linfocitos T CD8+ procedentes del mismo donante y que expresan la misma proteína de recombinación (p. ej., CAR) se administran por separado a un sujeto que las necesita. En algunos casos, las distintas administraciones se llevan a cabo simultánea o secuencialmente, en cualquier orden.
- 40

- En algunos casos, una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos de salida incluye al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 %, al menos un 99,9 %, o un o aproximadamente un 100 % de linfocitos T CD4+. En determinados casos, la composición de salida incluye al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 %, al menos un 99,9 %, o un o aproximadamente un 100 % de linfocitos T CD4+ que expresan el receptor recombinante y/o han sido transducidos o transfectados con el polinucleótido recombinante. En determinados casos, la composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos de salida incluye menos del 40 %, menos del 35 %, menos del 30 %, menos del 25 %, menos del 20 %, menos del 15 %, menos del 10 %, menos del 5 %, menos del 1 %, menos del 0,1 %, o menos del 0,01 % de linfocitos T CD8+, y/o no contiene linfocitos T CD8+, y/o está exenta o sustancialmente exenta de linfocitos T CD8+.
- 45
- 50

- En algunos casos, una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos de salida incluye al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 %, al menos un 99,9 %, o un o aproximadamente un 100 % de linfocitos T CD8+. En casos particulares, la composición incluye al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 %, al menos un 99,9 %, o un o aproximadamente un 100 % de linfocitos T CD8+ que expresan el receptor recombinante y/o han sido transducidos o transfectados con el polinucleótido recombinante. En determinados casos, la composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos de salida incluye menos del 40 %, menos del 35 %, menos del 30 %, menos del 25 %, menos del 20 %, menos del 15 %, menos del 10 %, menos del 5 %, menos del 1 %, menos del 0,1 %, o menos del 0,01 % de linfocitos T CD4+, y/o no contiene linfocitos T CD4+, y/o está exenta o sustancialmente exenta de linfocitos T CD4+.
- 55
- 60
- 65

En algunos casos, el proceso asociado a los métodos divulgados se compara con un proceso ilustrativo y/o alternativo.

En casos particulares, el proceso alternativo y/o ilustrativo puede diferir en uno o más casos específicos, pero, por lo demás, contiene similares o los mismos rasgos distintivos, casos, etapas, fases, reactivos y/o condiciones del proceso asociados a los métodos divulgados. En algunos casos, el proceso alternativo y/o ilustrativo es similar o el mismo que el proceso asociado a los métodos divulgados, con la excepción de que: las composiciones de linfocitos T CD4+ enriquecidos no se incuban y/o cultivan con IL-2 recombinante; las células se incuban con un reactivo estimulador en una proporción superior a 3 (o 3:1) de reactivo estimulador por célula; el reactivo estimulador no se elimina ni separa de las células antes del cultivo ni en los 6, 5 ó 4 días siguientes al inicio de la incubación en condiciones de estimulación; las células no se incuban en presencia de un antioxidante; las células no se modifican genéticamente con una cantidad o concentración bajas, p. ej., entre 1 µg/ml y 50 µg/ml, de un polication; las células no se cultivan con tensioactivo; y/o las células no se cultivan en condiciones de perfusión y/o mezcla constantes.

En determinados casos, el proceso se completa en una duración y/o tiempo de o de aproximadamente 35 días, 34 días, 33 días, 32 días, 31 días, 30 días, 29 días, 28 días, 27 días, 26 días, 25 días, 24 días, 23 días, 22 días, 21 días, 20 días, 19 días, 18 días, 17 días, 16 días, 15 días, 14 días, 13 días, 12 días, 11 días, 10 días, 9 días o menos de 9 días. En determinados casos, el proceso se completa en 21 días. En algunos casos, el proceso se considera completado cuando se cosecha y/o formula la composición; la composición está lista para ser cosechada y/o formulada; la composición ha alcanzado un valor umbral diana para la cosecha; y/o la composición se libera y/o está lista para las pruebas posteriores a la formulación.

En algunos casos, el proceso se completa en una duración y/o tiempo de o de aproximadamente 35 días, 34 días, 33 días, 32 días, 31 días, 30 días, 29 días, 28 días, 27 días, 26 días, 25 días, 24 días, 23 días, 22 días, 21 días, 20 días, 19 días, 18 días, 17 días, 16 días, 15 días, 14 días, 13 días, 12 días, 11 días, 10 días, 9 días o menos de 9 días, medido desde el inicio o recogida de la muestra biológica y/o el aislamiento, selección, estimulación, y/o enriquecimiento de células de entrada a partir de la muestra biológica hasta el momento en que las células de salida son liberadas para infusión; las células de salida se cosechan y/o formulan; las células de salida están listas para ser cosechadas y/o formuladas; las células de salida han alcanzado un valor umbral diana para la cosecha; y/o las células de salida se liberan y/o están listas para las pruebas posteriores a la formulación, incluidos los tiempos de conservación de las composiciones criocongeladas. En casos particulares, cuando el proceso se realiza en más de una composición de linfocitos T enriquecidos obtenidos de la misma muestra biológica, el proceso se completa cuando al menos una muestra representativa de todas y cada una de las composiciones de la misma muestra biológica ha completado el proceso. En algunos casos, el proceso se completa en un plazo de 21 días medidos desde el inicio o la recogida de la muestra biológica y/o el aislamiento, selección, estimulación, y/o enriquecimiento de células de entrada a partir de la muestra biológica hasta el momento en que las células de salida son liberadas para infusión.

En algunos casos, el proceso se completa en una duración y/o tiempo de o de aproximadamente 35 días, 34 días, 33 días, 32 días, 31 días, 30 días, 29 días, 28 días, 27 días, 26 días, 25 días, 24 días, 23 días, 22 días, 21 días, 20 días, 19 días, 18 días, 17 días, 16 días, 15 días, 14 días, 13 días, 12 días, 11 días, 10 días, 9 días o menos de 9 días, medido desde el inicio o recogida de la muestra biológica, p. ej., una muestra de aféresis o leucocitaféresis, hasta al momento en que la composición de salida es administrada o está lista para ser administrada al sujeto, las células de salida se cosechan y/o formulan; las células de salida están listas para ser cosechadas y/o formuladas; las células de salida han alcanzado un valor umbral diana para la cosecha; y/o la composición de salida se libera para ser probada, incluidos los tiempos de conservación de las composiciones criocongeladas. En algunos casos, el proceso se completa en 21 días medidos desde el inicio o recogida de la muestra biológica hasta el momento en que las células de salida están listas para ser y/o son liberadas para su infusión a un sujeto.

En determinados casos, la duración y/o el tiempo requerido para completar el proceso es entre 10 y 35 días, entre 12 días y 33 días, entre 17 días y 25 días, o entre 19 días y 23 días, p. ej., cuando se incluye el tiempo de conservación, para muestras obtenidas de un sujeto, para muestras de un número de sujetos, y/o para al menos un determinado porcentaje de sujetos, tales como los que tienen una indicación o enfermedad particular, tal como al menos el 90, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % o más de dichos sujetos. En determinados casos, la mediana del tiempo y/o duración para completar el proceso (tal como cuando se mide desde la toma de la muestra del sujeto hasta que el producto está listo o liberado para infusión al sujeto) en una pluralidad de composiciones de partida de diferentes muestras biológicas es entre 15 días y 27 días, entre 17 días y 25 días, o entre 19 días y 23 días o es o es aproximadamente 19 días, 20 días, 21 días, 22 días o 23 días, p. ej., cuando se incluye el tiempo de conservación. En casos particulares, la media del tiempo y/o duración para completar el proceso en una pluralidad de composiciones de diferentes muestras biológicas es entre 15 días y 27 días, entre 17 días y 25 días, o entre 19 días y 23 días o es o es aproximadamente 19 días, 20 días, 21 días, 22 días o 23 días, p. ej., si se incluye el tiempo de transporte y/o conservación. En casos particulares, la duración para completar el proceso en una pluralidad de composiciones de diferentes muestras biológicas está entre 15 días y 27 días, entre 17 días y 25 días, o entre 19 días y 23 días o es o es aproximadamente 19 días, 20 días, 21 días, 22 días o 23 días, p. ej., cuando se incluye el tiempo de conservación. En determinados casos, la duración del proceso, tal como en una variedad de composiciones de partida, tal como de diferentes muestras biológicas y/o sujetos con diferentes enfermedades, es menos de o no más de 21 días; en algunos casos, dicho resultado se consigue con un porcentaje superior al 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 % o 95 % de éxito en la fabricación del producto de dichas muestras o pacientes.

En algunos casos, la duración y/o el tiempo requerido para completar el proceso es entre 7 y 27 días, entre 9 días y

25 días, entre 11 días y 18 días, entre, o entre 11 días y 15 días cuando no se incluye ni se tiene en cuenta el tiempo de conservación de las células criocongeladas. En ciertos casos, la mediana del tiempo y/o duración requerido para completar el proceso en una pluralidad de composiciones de diferentes muestras biológicas es entre 7 días y 27 días, entre 9 días y 25 días, entre 11 días y 18 días, entre, o entre 11 días y 15 días, o es o es de aproximadamente 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, o 15 días si no se incluye ni se tiene en cuenta el tiempo de conservación de las células criocongeladas. En casos particulares, la media del tiempo y/o duración requerido para completar el proceso en una pluralidad de composiciones de diferentes muestras biológicas es entre 7 días y 27 días, entre 9 días y 25 días, entre 11 días y 18 días, entre, o entre 11 días y 15 días, o es o es de aproximadamente 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, o 15 días si no se incluye ni se tiene en cuenta el tiempo de conservación de las células criocongeladas. En algunos casos, la media del tiempo y/o duración requerido para completar el proceso en una pluralidad de composiciones de diferentes muestras biológicas es inferior a 21 días cuando no se incluye el tiempo de conservación de las células criocongeladas.

En casos particulares, el tiempo para completar el proceso en al menos el 10 % de una pluralidad de composiciones obtenidas de fuentes diferentes, p. ej., diferentes muestras biológicas y/o diferentes composiciones de linfocitos T enriquecidos aislados, enriquecidos y/o seleccionados a partir de diferentes muestras biológicas, es entre 7 y 18 días, entre 10 días y 17 días, o entre 11 días y 15 días o es o es aproximadamente 11 días, 12 días, o 13 días si no se incluye ni se tiene en cuenta el tiempo de conservación de las células criocongeladas. En casos particulares, el tiempo requerido para completar el proceso en al menos el 50 % de una pluralidad de composiciones de diferentes fuentes biológicas es entre 7 y 27 días, entre 9 días y 25 días, entre 11 días y 18 días, entre, o entre 11 días y 15 días, o es o es de aproximadamente 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, o 15 días si no se incluye ni se tiene en cuenta el tiempo de conservación de las células criocongeladas. En ciertos casos, el tiempo requerido para completar el proceso en al menos el 90 % de una pluralidad de composiciones de distintas fuentes es entre 7 y 27 días, entre 9 días y 25 días, entre 11 días y 18 días, entre, o entre 11 días y 15 días, o es o es de aproximadamente 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, o 15 días si no se incluye ni se tiene en cuenta el tiempo de conservación de las células criocongeladas. En ciertos casos, el tiempo requerido para completar el proceso en al menos el 90 % de una pluralidad de composiciones de distintas fuentes es inferior a 21 días si no se incluye el tiempo de conservación de las células criocongeladas.

En algunos casos, la duración y/o tiempo durante el proceso que transcurre desde el comienzo o inicio de la incubación en condiciones de estimulación hasta el momento en que se alcanza una cantidad, densidad, y/o grado de expansión umbral (tal como un factor de expansión particular, tal como cuatro veces o una dosis particular) durante el cultivo es entre 5 días y 25 días, entre 7 días y 18 días, entre 8 y 15 días, entre 8 y 14 días, o entre 8 y 15 días, tal como entre 8 y 13 días o entre 9 y 13 días. En determinados casos, la mediana de tiempo y/o duración del proceso que tiene lugar desde el comienzo o inicio de la incubación hasta el momento en que se alcanza el umbral es entre 5 días y 25 días, entre 7 días y 18 días, o entre 9 días y 13 días, o es o es aproximadamente 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días o 13 días. En casos particulares, la media de tiempo y/o duración del proceso que se produce desde el comienzo o inicio de la incubación hasta el momento en que se alcanza el umbral es entre 5 días y 25 días, entre 7 días y 18 días, entre 8 días y 13 días, o entre 9 días y 13 días, o es de o es de aproximadamente 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días o 13 días.

En determinados casos, la duración y/o tiempo durante el proceso que ocurre desde el comienzo o inicio de la incubación en condiciones de estimulación hasta el momento en que las células de salida se recogen, se formulan y/o criocongelan es de entre 5 y 25 días, entre 7 y 18 días entre 8 y 15 días, entre 8 y 14 días, o entre 8 y 15 días, tal como entre 8 y 13 días o entre 9 y 13 días. En determinados casos, la mediana de tiempo y/o duración del proceso que tiene lugar desde el comienzo o inicio de la incubación hasta el momento en que se alcanza el umbral es entre 5 días y 25 días, entre 7 días y 18 días, o entre 9 días y 13 días, o es o es aproximadamente 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días o 13 días. En casos particulares, la media de tiempo y/o duración del proceso que se produce desde el comienzo o inicio de la incubación hasta el momento en que se alcanza el umbral es entre 5 días y 25 días, entre 7 días y 18 días, entre 8 días y 13 días, o entre 9 días y 13 días, o es de o es de aproximadamente 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días o 13 días. En algunos casos, la duración y/o tiempo durante el proceso que ocurre desde el comienzo o inicio de la incubación en condiciones de estimulación hasta el momento en que las células de salida se recogen, se formulan y/o criocongelan es entre 9 días y 15 días durante, para aproximadamente, o para al menos un 85 %, 90 %, 95 % de los sujetos.

En algunos casos, la duración y/o tiempo durante el proceso que se produce desde el aislamiento, enriquecimiento y/o selección de las composiciones de linfocitos CD4+ y CD8+ enriquecidos a partir de una muestra biológica, p. ej., aféresis y/o leucocitaféresis, hasta el momento en que las células de salida se recogen, se formulan y/o criocongelan es de entre 5 y 25 días, entre 7 días y 18 días, entre 8 y 19 días, entre 8 y 14 días, o entre 10 y 16 días. En determinados casos, las células de salida se recogen, se formulan y cosechan entre 10 y 16 días después del aislamiento, enriquecimiento y/o selección para al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, de los sujetos.

En algunos casos, la duración y/o tiempo del proceso desde el inicio o comienzo de la incubación en condiciones de estimulación hasta el momento en que se alcanza la cantidad, densidad y/o expansión umbral durante el cultivo es de al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, o al menos un 90 %

menos de tiempo que el de un proceso ilustrativo y/o alternativo. En casos particulares, la duración y/o tiempo durante el proceso desde el comienzo o inicio de la incubación en condiciones de estimulación hasta el momento en que se alcanza la cantidad, densidad y/o expansión umbral durante el cultivo es menor que la duración y/o tiempo de un proceso ilustrativo y/o alternativo en, en aproximadamente, o en al menos 0,5 días, 1 día, 1,5 días, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días o más de 14 días.

En determinados casos, el tiempo necesario para que al menos el 10 % de una pluralidad de composiciones de diferentes muestras biológicas alcance la cantidad, densidad y/o expansión umbral desde el inicio o comienzo de la incubación en condiciones de estimulación hasta el momento en que se alcanza la cantidad, densidad y/o expansión umbral durante el cultivo es entre 5 días y 20 días, entre 7 días y 15 días, o entre 9 días y 11 días, o es o es aproximadamente 7 días, 8 días, 9 días o 10 días. En casos particulares, el tiempo necesario para que al menos el 50 % de una pluralidad de composiciones de diferentes muestras biológicas alcance la cantidad, densidad y/o expansión umbral desde el inicio o comienzo de la incubación en condiciones de estimulación es entre 5 días y 25 días, entre 7 días y 18 días, o entre 9 días y 13 días, o es o es aproximadamente 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días. En algunos casos, el tiempo necesario para que al menos el 90 % de una pluralidad de composiciones de diferentes muestras biológicas alcance la cantidad, densidad y/o expansión umbral desde el inicio o comienzo de la incubación en condiciones de estimulación es entre 5 días y 25 días, entre 7 días y 18 días, o entre 9 días y 13 días, o es o es aproximadamente 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días.

En algunos casos, los métodos divulgados en el presente documento se utilizan con relación a un proceso que genera linfocitos T modificados genéticamente en un periodo de tiempo inferior al de un proceso alternativo ilustrativo. En algunos casos, la corta duración del proceso puede aumentar la tasa, casos y/o probabilidad de generar una composición de linfocitos T modificados genéticamente que pueda administrarse a un sujeto para terapia celular. En determinados casos, los protocolos de fabricación de composiciones de células terapéuticas pueden requerir que las composiciones de células se produzcan y liberen para infusión en un plazo de tiempo determinado. Por lo tanto, en algunos casos, se podría esperar que la menor duración del proceso redujera o eliminara los fallos del proceso que se producirían por composiciones de células que no consiguen expandirse en el tiempo requerido.

En algunos casos del proceso divulgado en el presente documento, el tiempo requerido para que una composición de células alcance una cantidad, densidad y/o expansión umbral desde el inicio o comienzo de la incubación en condiciones de estimulación hasta el momento en que se alcanza la cantidad, densidad y/o expansión umbral durante el cultivo es entre aproximadamente 9 días y aproximadamente 13 días, o entre 9 días y 13 días, o 9 días, mientras que en el proceso alternativo, el tiempo correspondiente es entre aproximadamente 12 días y aproximadamente 23 días, o entre 12 días y 23 días, o aproximadamente 15 días, o 15 días. En algunos casos, el tiempo requerido para la recogida de muestras, aislamiento de las composiciones de células y criocongelación tanto en el proceso divulgado como en el proceso alternativo es entre aproximadamente 1 día y aproximadamente 2 días, o entre 1 día y 2 días. En algunos casos, las composiciones de células criocongeladas tanto en el proceso divulgado como en el proceso alternativo se conservan durante aproximadamente 3 días o durante 3 días. En algunos casos, el tiempo requerido desde que se alcanza la cantidad, densidad y/o expansión umbral o desde que las composiciones de células son cosechadas hasta que la composición de salida es administrada o está lista para ser administrada al sujeto tanto en el proceso divulgado como en el proceso alternativo es de o aproximadamente 5 días. En algunos casos, el tiempo total requerido desde la recogida de la muestra hasta que la composición de salida se administra o está lista para ser administrada al sujeto en el proceso divulgado es o es aproximadamente 19 días, mientras que en el proceso alternativo, el tiempo total correspondiente es o es aproximadamente 25 días.

En determinados casos, el tiempo total requerido para el 50 % o aproximadamente el 50 % de una pluralidad de composiciones de células desde la recogida de la muestra hasta el momento en que las composiciones de salida se administran o están listas para ser administradas al sujeto (lo que requeriría que las composiciones de células alcanzaran la cantidad, densidad, y/o expansión umbral) en el proceso divulgado es o es aproximadamente 19 días, mientras que en el proceso alternativo, el tiempo total correspondiente es o es aproximadamente 25 días. En determinados casos, el tiempo total requerido para el 80 % o aproximadamente el 80 % de una pluralidad de composiciones de células desde la recogida de la muestra hasta el momento en que las composiciones de salida se administran o están listas para ser administradas al sujeto (lo que requeriría que las composiciones de células alcanzaran la cantidad, densidad, y/o expansión umbral) en el proceso divulgado es o es aproximadamente 21 días, mientras que en el proceso alternativo, el tiempo total correspondiente es o es aproximadamente 27 días. En determinados casos, el tiempo total requerido para el 90 % o aproximadamente el 90 % de una pluralidad de composiciones de células desde la recogida de la muestra hasta el momento en que las composiciones de salida se administran o están listas para ser administradas al sujeto (lo que requeriría que las composiciones de células alcanzaran la cantidad, densidad, y/o expansión umbral) en el proceso divulgado es o es aproximadamente 21 días, mientras que en el proceso alternativo, el tiempo total correspondiente es o es aproximadamente 33 días desde el inicio o comienzo de la incubación en condiciones de estimulación hasta el momento en que se alcanza la cantidad, densidad y/o expansión umbral durante el cultivo es

En determinados casos, los métodos divulgados se utilizan con relación a la generación o producción con éxito de composiciones de linfocitos T modificados genéticamente de salida que son adecuadas para su uso en terapia celular. En algunos casos, se genera con éxito una composición de salida si las células de la composición alcanzan el recuento

de células, densidad y/o expansión umbral durante el cultivo. En casos particulares, una composición de salida se genera con éxito si las células de al menos el 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de las células expresan el receptor recombinante. En casos particulares, se produce o genera con éxito una composición de salida si la composición de salida es adecuada para uso terapéutico, p. ej., como terapia celular autóloga. En casos particulares, una composición de salida es adecuada para uso terapéutico si las células de las composiciones de salida cumplen uno o más criterios. En algunos casos, las células y/o composiciones de células adecuadas para su uso en terapia celular son estériles (p. ej., carecen de contaminación microbiana detectable), están exentas de endotoxinas, están exentas de virus competentes para la replicación, son viables, activas (p. ej., que posean actividad citolítica y/o liberan citocinas en respuesta a un antígeno diana), y/o contienen una elevada porción de células que expresan el receptor recombinante.

En casos particulares, los métodos divulgados tienen al menos un 80 %, al menos un 81 %, al menos un 82 %, al menos un 83 %, al menos un 84 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % de probabilidad de generar o producir con éxito una composición de linfocitos T enriquecidos de salida a partir de una composición de células de entrada y/o una muestra biológica. En determinados casos, la probabilidad o verosimilitud se sitúa entre el 85 % y el 100 %, entre el 90 % y el 95 % o entre el 92 % y el 94 %. En determinados casos, los métodos divulgados generan o producen con éxito una composición de linfocitos T enriquecidos de salida de al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 81 %, al menos un 82 %, al menos un 83 %, al menos un 84 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % de composiciones y/o muestras de una pluralidad de composiciones de células de entrada y/o de una pluralidad de muestras biológicas. En algunos casos, los métodos divulgados generan o producen con éxito una composición de linfocitos T enriquecidos de salida de entre un 85 % y un 100 %, entre un 90 % y un 95 %, o entre un 92 % y un 94 % de composiciones y/o muestras de una pluralidad de composiciones de células de entrada y/o de una pluralidad de muestras biológicas.

En determinados casos, el proceso se completa en 21 días y tiene un índice de éxito de al menos un 85 %, 90 %, 95 % o más. En algunos casos, el proceso se considera completado cuando las células de salida son administradas y/o están listas para ser administradas al sujeto. En algunos casos, el proceso se considera completado cuando la composición de salida ha sido cosechada y/o está lista para ser probada y/o evaluada, p. ej., tal como para un ensayo de liberación.

En casos particulares, el proceso asociado a los métodos divulgados tiene una probabilidad o verosimilitud de generar o producir con éxito una composición de salida que es mayor que la probabilidad o verosimilitud para un proceso alternativo y/o ilustrativo de generar o producir con éxito una composición de salida en al menos un 0,5 %, al menos un 1 %, al menos un 1,5 %, al menos un 2 %, al menos un 2,5 %, al menos un 3 %, al menos un 3,5 %, al menos un 4,0 %, al menos un 4,5 %, al menos un 5 %, al menos un 5,5 %, al menos un 6 %, al menos un 6,5 %, al menos un 7 %, al menos un 7,5 %, al menos un 8 %, al menos un 8,5 %, al menos un 9 %, al menos un 9,5 %, o al menos un 10 %, o en más de un 10 %.

En determinados casos, el proceso asociado a los métodos divulgados tiene una probabilidad o verosimilitud de generar o producir con éxito una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos de salida que es mayor que la probabilidad o verosimilitud para un proceso alternativo y/o ilustrativo de generar o producir con éxito una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos de salida en al menos un 0,5 %, al menos un 1 %, al menos un 1,5 %, al menos un 2 %, al menos un 2,5 %, al menos un 3 %, al menos un 3,5 %, al menos un 4,0 %, al menos un 4,5 %, al menos un 5 %, al menos un 5,5 %, al menos un 6 %, al menos un 6,5 %, al menos un 7 %, al menos un 7,5 %, al menos un 8 %, al menos un 8,5 %, al menos un 9 %, al menos un 9,5 %, o al menos un 10 %, o en más de un 10 %.

En casos particulares, el proceso asociado a los métodos divulgados tiene una probabilidad o verosimilitud de generar o producir con éxito una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos de salida que es mayor que la probabilidad o verosimilitud para un proceso alternativo y/o ilustrativo de generar o producir con éxito una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos de salida en al menos un 0,5 %, al menos un 1 %, al menos un 1,5 %, al menos un 2 %, al menos un 2,5 %, al menos un 3 %, al menos un 3,5 %, al menos un 4,0 %, al menos un 4,5 %, al menos un 5 %, al menos un 5,5 %, al menos un 6 %, al menos un 6,5 %, al menos un 7 %, al menos un 7,5 %, al menos un 8 %, al menos un 8,5 %, al menos un 9 %, al menos un 9,5 %, o al menos un 10 %, o en más de un 10 %.

En algunos casos, la una o más composiciones de salida generadas o producidas con relación a los métodos divulgados contienen células que expresan un receptor recombinante, p. ej., un TCR o un CAR. En algunos casos, expresar un receptor recombinante puede incluir, aunque no de forma limitativa, que tengan una o más proteínas receptoras recombinantes localizadas en la membrana y/o superficie celular, que tengan una cantidad detectable de proteína receptora recombinante, que tengan una cantidad detectable de ARNm que codifique el receptor recombinante, que tengan o contengan un polinucleótido recombinante que codifique el receptor recombinante, y/o que tengan o contengan un ARNm o una proteína que sea un marcador sustitutivo de la expresión del receptor recombinante.

En algunos casos, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 97 %, al menos un 99 %, o más de un 99 % de las células de la una o más composiciones de salida expresan el receptor recombinante. En casos particulares, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 97 %, al menos un 99 %, o más de un 99 % de los linfocitos T CD4+ de una composición de salida expresan el receptor recombinante. En algunos casos, entre el 30 % y el 90 %, entre el 40 % y el 85 %, entre el 50 % y el 80 %, o entre el 60 % y el 80 % de los linfocitos T CD4+ expresan el receptor recombinante. En casos particulares, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 97 %, o al menos un 99 % de las células de una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos de salida expresan el receptor recombinante. En determinados casos, entre el 30 % y el 90 %, entre el 40 % y el 85 %, entre el 50 % y el 80 %, o entre el 60 % y el 80 % de las células de una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos de salida expresan el receptor recombinante.

En determinados casos, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 97 %, al menos un 99 %, o más de un 99 % de los linfocitos T CD8+ de una composición de salida expresan el receptor recombinante. En algunos casos, entre el 30 % y el 90 %, entre el 40 % y el 85 %, entre el 50 % y el 80 %, o entre el 60 % y el 80 % de los linfocitos T CD8+ expresan el receptor recombinante. En casos particulares, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 97 %, o al menos un 99 % de las células de una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos de salida expresan el receptor recombinante. En determinados casos, entre el 30 % y el 90 %, entre el 40 % y el 85 %, entre el 50 % y el 80 %, o entre el 60 % y el 80 % de las células de una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos de salida expresan el receptor recombinante.

En algunos casos, el porcentaje de células de la composición de salida que expresan el receptor recombinante es mayor que el porcentaje de células que expresan el receptor recombinante que se produjeron o generaron mediante un proceso alternativo y/o ilustrativo, tal como al menos un 0,5 %, al menos un 1 %, al menos un 1,5 %, al menos un 2 %, al menos un 2,5 %, al menos un 3 %, al menos un 3,5 %, al menos un 4,0 %, al menos un 4,5 %, al menos un 5 %, al menos un 5,5 %, al menos un 6 %, al menos un 6,5 %, al menos un 7 %, al menos un 7,5 %, al menos un 8 %, al menos un 8,5 %, al menos un 9 %, al menos un 9,5 %, o al menos un 10 %, o en más de un 10 %.

En determinados casos, el porcentaje de linfocitos T CD4+ de la composición de salida que expresan el receptor recombinante es mayor que el porcentaje de linfocitos T CD4+ que expresan el receptor recombinante que se produjeron o generaron mediante un proceso alternativo y/o ilustrativo, tal como al menos un 0,5 %, al menos un 1 %, al menos un 1,5 %, al menos un 2 %, al menos un 2,5 %, al menos un 3 %, al menos un 3,5 %, al menos un 4,0 %, al menos un 4,5 %, al menos un 5 %, al menos un 5,5 %, al menos un 6 %, al menos un 6,5 %, al menos un 7 %, al menos un 7,5 %, al menos un 8 %, al menos un 8,5 %, al menos un 9 %, al menos un 9,5 %, o al menos un 10 %, o en más de un 10 %.

En algunos casos, el porcentaje de linfocitos T CD8+ de la composición de salida que expresan el receptor recombinante es mayor que el porcentaje de linfocitos T CD8+ que expresan el receptor recombinante que se produjeron o generaron mediante un proceso alternativo y/o ilustrativo, tal como al menos un 0,5 %, al menos un 1 %, al menos un 1,5 %, al menos un 2 %, al menos un 2,5 %, al menos un 3 %, al menos un 3,5 %, al menos un 4,0 %, al menos un 4,5 %, al menos un 5 %, al menos un 5,5 %, al menos un 6 %, al menos un 6,5 %, al menos un 7 %, al menos un 7,5 %, al menos un 8 %, al menos un 8,5 %, al menos un 9 %, al menos un 9,5 %, o al menos un 10 %, o en más de un 10 %.

En algunos casos, la una o más composiciones de salida generadas o producidas por los métodos divulgados contienen células activadas, y/o contienen células que tienen o muestran uno o más marcadores de activación. En casos particulares, las células de las composiciones de salida producidas o generadas por los métodos divulgados están más activadas y/o tienen o muestran una mayor cantidad o grado de uno o más marcadores de activación que las células que se generan o producen mediante un proceso ilustrativo y/o alternativo. Los marcadores de activación pueden incluir cualquier marcador conocido que indique, se correlacione con y/o se asocie con un estado de activación en una célula inmunitaria, tal como un linfocito T. En algunos casos, los marcadores de activación incluyen, pero no se limitan a, aumento de la complejidad intracelular (p. ej., determinada por la medición de la dispersión lateral (SSC), aumento del tamaño celular (p. ej., determinado mediante la medición del diámetro celular y/o la dispersión frontal (FSC), aumento de la expresión de CD27 y/o reducción de la expresión de CD25.

En algunos casos, las células de salida que se generan o producen por los métodos divulgados son más grandes que las células generadas o producidas por el proceso alternativo y/o ilustrativo. En algunos casos, los parámetros FSC y/o SSC se miden y comparan con una referencia y/o un patrón para evaluar el tamaño de las células, tal como



mediante citometría de flujo. En determinados casos, se mide el parámetro FSC y se compara con una referencia o patrón para evaluar el tamaño de las células. En algunos casos, el diámetro de la célula, p. ej., la mediana o media del diámetro celular, de las células de la composición de salida es de al menos 0,25 µm, 0,5 µm, 0,75 µm, 1,0 µm, 1,5 µm, 2 µm, 2,5 µm, 3 µm, 3,5 µm, 4 µm, 4,5 µm, 5 µm, o más de 5 µm mayor que el diámetro de las células generadas o producidas por el proceso alternativo y/o ilustrativo.

En determinados casos, las células de salida están activas y se expanden, y/o son capaces de activarse y expandirse, *in vivo*, cuando se administran a un sujeto. En casos particulares, las células de salida muestran rasgos distintivos y/o características que indican y/o se asocian con la eficacia, actividad y/o expansión *in vivo*. Por ejemplo, en algunos casos, dichos rasgos distintivos o caracteres pueden incluir la expresión de una proteína, tal como una proteína de superficie, que se asocia a la activación, proliferación y/o expansión. En algunos casos, dichos rasgos distintivos o característica pueden incluir la producción o secreción de factores tales como citocinas, p. ej., en respuesta a la exposición a un antígeno.

En determinados casos, las células de salida que se generan o producen por los métodos divulgados tienen mayor expresión de CD25 que las células que se generan o producen por el proceso alternativo y/o ilustrativo. En algunos casos, los linfocitos T CD4+ de salida tienen una mayor expresión de CD25 que los linfocitos T CD4+ generados o producidos por el proceso alternativo y/o ilustrativo. En algunos casos, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 100 %, de las células de la composición de salida son positivas para la tinción CD25, p. ej., expresan una cantidad detectable de CD25. En casos particulares, la composición de salida contiene una mayor porción de células positivas para CD25 que una composición de células producidas o generadas por el proceso alternativo y/o ilustrativo. En algunos casos, las células de la composición de salida expresan al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 100 %, al menos un 150 %, al menos 1 vez, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces o al menos 5 veces, más CD25, p. ej., como se indica midiendo la media o la mediana de la expresión de CD25 en las células de la composición de salida mediante citometría de flujo, en comparación con las células producidas o generadas por el proceso alternativo y/o ilustrativo.

En algunos casos, la expresión de CD27 por las células de salida que se generan o producen por los métodos divulgados se reduce en comparación con la expresión de CD27 en las células que se generan o producen por el proceso alternativo y/o ilustrativo. En algunos casos, una mayor porción de las células de la composición de salida son CD27 negativas y/o tienen niveles bajos o indetectables de CD27 que la porción de células generadas o producidas por el proceso alternativo y/o ilustrativo. En algunos casos, la expresión de CD27, p. ej., la media o la mediana de la expresión de CD27 medida por citometría de flujo, por las células de la composición de salida se reduce en al menos un 1 %, al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, o al menos un 99 % en comparación con las células generadas o producidas en el proceso alternativo y/o ilustrativo.

En determinados casos, las células de salida que se generan o producen mediante los métodos divulgados tienen una mayor expresión de marcadores asociados a la división celular que las células que se generan o producen mediante el proceso alternativo y/o ilustrativo. En algunos casos, las células de salida expresan Ki67. En algunos casos, una porción mayor de linfocitos T CD4+ de salida expresan Ki67 que la porción de linfocitos T CD4+ generados o producidos por el proceso alternativo y/o ilustrativo. En determinados casos, una porción mayor de linfocitos T CD8+ de salida expresan Ki67 que la porción de linfocitos T CD8+ generados o producidos por el proceso alternativo y/o ilustrativo. En casos particulares, la composición de salida contiene una mayor porción de células positivas para Ki67 que una composición de células producidas o generadas por el proceso alternativo y/o ilustrativo. En algunos casos, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 100 %, de las células de la composición de salida son positivas para la tinción Ki67, p. ej., expresan una cantidad detectable de Ki67. En algunos casos, las células de la composición de salida expresan al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 100 %, al menos un 150 %, al menos 1 vez, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, más Ki67, p. ej., como se indica midiendo la media o la mediana de la expresión de Ki67 en las células de la composición de salida mediante citometría de flujo, en comparación con las células producidas o generadas por el proceso alternativo y/o ilustrativo.

En algunos casos, las células de salida tienen una mayor producción y/o secreción, y/o son capaces de una mayor producción y/o secreción de una o más citocinas, p. ej., en respuesta a la exposición a un antígeno. En algunos casos, las células de salida tienen una mayor producción y/o secreción, y/o son capaces de una mayor producción y/o secreción de IFN-gamma en comparación con las células que se producen o generan mediante un proceso alternativo y/o ilustrativo. En algunos casos, los linfocitos T CD8+ de la composición de salida, p. ej., los linfocitos T CD8+ que expresan el receptor recombinante, tienen una mayor producción y/o secreción, y/o son capaces de una mayor producción y/o secreción de IFN-gamma en comparación con las células que se producen o generan mediante un proceso alternativo y/o ilustrativo. En algunos casos, la producción o secreción por las células de salida es de al menos



un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 100 %, al menos un 150 %, al menos 1 vez, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, o al menos 5 veces mayor que la producción o secreción por células producidas por un proceso alternativo y/o ilustrativo.

5 En determinados casos, las células de salida tienen una mayor producción y/o secreción, y/o son capaces de una mayor producción y/o secreción de TNF-alfa en comparación con las células que se producen o generan mediante un proceso alternativo y/o ilustrativo. En algunos casos, los linfocitos T CD8+ de la composición de salida, p. ej., los linfocitos T CD8+ que expresan el receptor recombinante, tienen una mayor producción y/o secreción, y/o son capaces de una mayor producción y/o secreción de TNF-alfa en comparación con las células que se producen o generan mediante un proceso alternativo y/o ilustrativo. En algunos casos, la producción o secreción por las células de salida es de al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 100 %, al menos un 150 %, al menos 1 vez, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, o al menos 5 veces mayor que la producción o secreción por células producidas por un proceso alternativo y/o ilustrativo.

10 En determinados casos, las células de salida tienen una menor producción y/o secreción de una o más citocinas, p. ej., en respuesta a la exposición a un antígeno en comparación con las células que se producen o generan mediante un proceso alternativo y/o ilustrativo. En casos particulares, las células de salida tienen una menor producción y/o secreción de IFN-gamma. En determinados casos, los linfocitos T CD4+ de la composición de salida, p. ej., los linfocitos T CD4+ que expresan el receptor recombinante, tienen una menor producción y/o secreción de IFN-gamma en comparación con los linfocitos T CD4+ que se producen o generan mediante un proceso alternativo y/o ilustrativo. En algunos casos, la producción o secreción de IFN-gamma por las células de salida, p. ej., linfocitos T CD4+ que expresan el receptor recombinante, se reduce al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, o al menos un 99 % en comparación con la producción o secreción por células producidas por un proceso alternativo y/o ilustrativo.

20 En casos particulares, las células de salida tienen una menor producción y/o secreción de IL-2. En algunos casos, los linfocitos T CD4+ de la composición de salida, p. ej., los linfocitos T CD4+ que expresan el receptor recombinante, tienen una menor producción y/o secreción de IL-2 en comparación con los linfocitos T CD4+ que se producen o generan mediante un proceso alternativo y/o ilustrativo. En algunos casos, la producción o secreción de IL-2 por las células de salida, p. ej., linfocitos T CD4+ que expresan el receptor recombinante, se reduce al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, o al menos un 99 % en comparación con la producción o secreción por células producidas por un proceso alternativo y/o ilustrativo.

30 En determinados casos, las células de salida tienen una menor producción y/o secreción de GM-CSF. En casos particulares, los linfocitos T CD4+ de la composición de salida, p. ej., los linfocitos T CD4+ que expresan el receptor recombinante, tienen una menor producción y/o secreción de GM-CSF en comparación con los linfocitos T CD4+ que se producen o generan mediante un proceso alternativo y/o ilustrativo. En determinados casos, la producción o secreción de GM-CSF por las células de salida, p. ej., linfocitos T CD4+ que expresan el receptor recombinante, se reduce al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, o al menos un 99 % en comparación con la producción o secreción por células producidas por un proceso alternativo y/o ilustrativo.

40 En casos particulares, las células de salida tienen una menor producción y/o secreción de MIP1-alfa. En algunos casos, los linfocitos T CD4+ de la composición de salida, p. ej., los linfocitos T CD4+ que expresan el receptor recombinante, tienen una menor producción y/o secreción de MIP1-alfa en comparación con los linfocitos T CD4+ que se producen o generan mediante un proceso alternativo y/o ilustrativo. En determinados casos, la producción o secreción de MIP1-alfa por las células de salida, p. ej., linfocitos T CD4+ que expresan el receptor recombinante, se reduce al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, o al menos un 99 % en comparación con la producción o secreción por células producidas por un proceso alternativo y/o ilustrativo.

50 En casos particulares, las células de salida que se generan o producen mediante los métodos divulgados tienen menos expresión de marcadores asociados a la apoptosis, p. ej., niveles de caspasas activadas y/o tinción positiva con anexina V, que las células generadas o producidas por el proceso alternativo y/o ilustrativo.

55 En algunos casos, los linfocitos T CD4+ de salida contienen menos células anexina V+ que los linfocitos T CD4+ generados o producidos por el proceso alternativo y/o ilustrativo. En algunos casos, menos del 25 %, menos del 20 %, menos del 18 %, menos del 16 %, menos del 15 %, menos del 14 %, menos del 13 %, menos del 12 %, menos del 11 %, menos del 10 %, menos del 8 %, menos del 6 %, menos del 5 %, menos del 3 %, menos del 1 %, o menos del 0,1 % de los linfocitos CD4+ de la composición de salida son positivos para la tinción de anexina V, p. ej., se unen y/o son capaces de unirse a la anexina V, tal como la anexina V recombinante y/o marcada. En ciertos casos, menos del 25 %, menos del 20 %, menos del 18 %, menos del 16 %, menos del 15 %, menos del 14 %, menos del 13 %, menos

del 12 %, menos del 11 %, menos del 10 %, menos del 8 %, menos del 6 %, menos del 5 %, menos del 3 %, menos del 1 %, o menos del 0,1 % de los linfocitos CD4+ de la composición de salida que expresan el receptor recombinante son positivos para la tinción de anexina V.

5 En determinados casos, los linfocitos T CD8+ de salida contienen menos células anexina V+ que los linfocitos T CD4+ generados o producidos por el proceso alternativo y/o ilustrativo. En casos particulares, menos del 25 %, menos del 20 %, menos del 18 %, menos del 16 %, menos del 15 %, menos del 14 %, menos del 13 %, menos del 12 %, menos del 11 %, menos del 10 %, menos del 8 %, menos del 6 %, menos del 5 %, menos del 3 %, menos del 1 %, o menos del 0,1 % de los linfocitos CD8+ de la composición de salida son positivos para la tinción de anexina V. En  
10 determinados casos, menos del 25 %, menos del 20 %, menos del 18 %, menos del 16 %, menos del 15 %, menos del 14 %, menos del 13 %, menos del 12 %, menos del 11 %, menos del 10 %, menos del 8 %, menos del 6 %, menos del 5 %, menos del 3 %, menos del 1 %, o menos del 0,1 % de los linfocitos CD8+ de la composición de salida que expresan el receptor recombinante son positivos para la tinción de anexina V.

15 En determinados casos, los linfocitos T CD4+ de salida contienen menos células positivas para una caspasa activada, p. ej., la caspasa 3 activada, que los linfocitos T CD4+ generados o producidos por el proceso alternativo y/o ilustrativo. En casos particulares, menos del 25 %, menos del 20 %, menos del 18 %, menos del 16 %, menos del 15 %, menos del 14 %, menos del 13 %, menos del 12 %, menos del 11 %, menos del 10 %, menos del 8 %, menos del 6 %, menos del 5 %, menos del 3 %, menos del 1 %, o menos del 0,1 % de los linfocitos CD4+ de la composición de salida son  
20 positivos para una caspasa activada, p. ej., la caspasa 3 activada. En determinados casos, menos del 25 %, menos del 20 %, menos del 18 %, menos del 16 %, menos del 15 %, menos del 14 %, menos del 13 %, menos del 12 %, menos del 11 %, menos del 10 %, menos del 8 %, menos del 6 %, menos del 5 %, menos del 3 %, menos del 1 %, o menos del 0,1 % de los linfocitos CD4+ de la composición de salida que expresan el receptor recombinante son positivos para una caspasa activada, p. ej., la caspasa 3 activada.

25 En algunos casos, los linfocitos T CD8+ de salida contienen menos células positivas para una caspasa activada, p. ej., la caspasa 3 activada, que los linfocitos T CD4+ generados o producidos por el proceso alternativo y/o ilustrativo. En determinados casos, menos del 25 %, menos del 20 %, menos del 18 %, menos del 16 %, menos del 15 %, menos del 14 %, menos del 13 %, menos del 12 %, menos del 11 %, menos del 10 %, menos del 8 %, menos del 6 %, menos del 5 %, menos del 3 %, menos del 1 %, o menos del 0,1 % de los linfocitos CD8+ de la composición de salida son  
30 positivos para una caspasa activada, p. ej., la caspasa 3 activada. En determinados casos, menos del 25 %, menos del 20 %, menos del 18 %, menos del 16 %, menos del 15 %, menos del 14 %, menos del 13 %, menos del 12 %, menos del 11 %, menos del 10 %, menos del 8 %, menos del 6 %, menos del 5 %, menos del 3 %, menos del 1 %, o menos del 0,1 % de los linfocitos CD8+ de la composición de salida que expresan el receptor recombinante son  
35 positivos para una caspasa activada, p. ej., la caspasa 3 activada.

En determinados casos, las células de la composición de salida se administran a un sujeto. En algunos casos, las células de la composición de salida se administran para tratar una enfermedad o afección. En algunos casos, la enfermedad o afección es cáncer. En algunos casos, las células las composiciones de salida se administran al sujeto,  
40 y el sujeto experimenta una reducción de las células cancerosas y/o del volumen del tumor. En algunos casos, el sujeto tiene, o tiene aproximadamente o tiene al menos un 25 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 % de reducción de la cantidad de células cancerosas y/o reducción del tumor tras la administración de las células de la composición de salida, p. ej., en comparación con la cantidad de células cancerosas y/o el volumen tumoral en el sujeto antes de la administración. En algunos casos, la administración de células de la  
45 composición de salida produce una mayor reducción del volumen tumoral y/o de la cantidad de células cancerosas en el sujeto en comparación con la reducción del volumen tumoral y/o de la cantidad de células cancerosas en el sujeto tras la administración de células de salida producidas mediante un proceso alternativo ilustrativo.

En casos particulares, la administración de células de la composición de salida tiene como resultado un aumento de la reducción del volumen del tumor y/o de la cantidad de células cancerosas en el sujeto de, de aproximadamente, o de al menos el 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 125 %, 150 %, 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, o 5 veces, en comparación con la reducción del volumen tumoral y/o la cantidad de células cancerosas en el sujeto tras la administración de células de salida producidas mediante un proceso alternativo  
50 ilustrativo.

55 En casos particulares, las células de la composición de salida, p. ej., una porción y/o una dosis de células de la composición de salida, se administran a un sujeto. En algunos casos, el sujeto al que se administran células de la composición de salida tiene una probabilidad y/o una verosimilitud de lograr y/o experimentar una respuesta completa (RC). En determinados casos, la probabilidad de lograr o experimentar una RC es de al menos un 10 %, al menos un  
60 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 95 %. En determinados casos, la probabilidad y/o verosimilitud de alcanzar o experimentar una RC es de al menos el 25 %. En casos particulares, la probabilidad y/o verosimilitud de alcanzar la RC es de al menos el 50 %.

65 En determinados casos, el sujeto al que se le administran células de la composición de salida tiene una probabilidad

y/o una verosimilitud de lograr y/o experimentar una TRO. En determinados casos, la posibilidad y/o verosimilitud de lograr y/o experimentar una TRO es de al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 95 %. En determinados casos, la probabilidad y/o verosimilitud de alcanzar y/o experimentar una TRO es de al menos el 80 %. En casos particulares, la probabilidad y/o verosimilitud de alcanzar una TRO es de al menos el 90 %. En determinados casos, la probabilidad y/o verosimilitud de alcanzar la TRO es o es aproximadamente el 100 %.

En algunos casos, la eficacia de las células de salida, p. ej., la probabilidad de que un sujeto alcance y/o experimente RC o TRO tras la administración de células de la composición de salida, es mayor que la de una composición de células terapéutica que contenga células que expresen un receptor recombinante producido por un proceso alternativo. En determinados casos, hay al menos 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 125 %, 150 %, 1 vez, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces, o 100 veces más de probabilidades de lograr RC o TRO tras la administración de las células de salida en comparación con la administración de las células de la composición de células terapéutica que se producen por el proceso alternativo.

En algunos casos, las células de salida producidas por los métodos divulgados en el presente documento tienen un grado de seguridad alto y/o relativamente alto. En algunos casos, las células de la composición de salida, p. ej., una porción y/o una dosis de células de la composición de salida, se administran a un sujeto. En algunos casos, el sujeto al que se administran células de la composición de salida tiene un riesgo, probabilidad y/o verosimilitud de experimentar una toxicidad, p. ej., SLC o neurotoxicidad, que es inferior al 80 %, 75 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o 5 %. En algunos casos, la toxicidad es de cualquier grado de neurotoxicidad o SLC. En determinados casos, el sujeto al que se han administrado células de la composición de salida tiene un riesgo, probabilidad y/o verosimilitud de menos del 80 % de experimentar cualquier grado de SLC o neurotoxicidad. En casos particulares, el sujeto al que se han administrado células de la composición de salida tiene un riesgo, probabilidad y/o verosimilitud de menos del 80 % de experimentar cualquier grado de SLC o neurotoxicidad.

En algunos casos, las células de la composición de salida, p. ej., una porción y/o una dosis de células de la composición de salida, son más seguras que las células de una composición de salida producida por un proceso alternativo. En algunos casos, la incidencia o probabilidad de experimentar neurotoxicidad de cualquier grado, grado 3 o superior, grado 3 prolongado o superior, grado 4 o superior, o de grado 5 es inferior al 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, o inferior al 95 % de la incidencia y/o probabilidad tras la administración de células de salida producidas por un proceso alternativo.

En determinados casos, los métodos divulgados se utilizan con relación a un proceso que genera una o más composiciones de linfocitos T enriquecidos de salida que se modifican genéticamente para expresar un receptor recombinante con una tasa de éxito de al menos el 85 % (p. ej., genera con éxito composiciones de células de salida a partir de al menos el 85 % de una pluralidad de muestras biológicas diferentes y/o composiciones de células de entrada), tal como una tasa de éxito de entre el 92 % y el 94 %. En algunos casos, el proceso incluye las etapas para incubar las células en condiciones de estimulación; modificar genéticamente las células estimuladas para que expresen o contengan un polinucleótido recombinante, p. ej., un polinucleótido que codifica un receptor recombinante tal como un CAR; y cultivar las células modificadas hasta una cantidad, densidad o expansión umbral. En algunos casos, la duración y/o el tiempo requerido para completar estas etapas es entre 8 y 15 días o entre 9 y 13 días. En determinados casos, el proceso incluye etapas para recoger u obtener una muestra biológica; aislar, seleccionar o enriquecer las células de entrada de la muestra biológica; criocongelar y conservar las células de entrada; descongelar y/o incubar las células de entrada en condiciones de estimulación; modificar genéticamente las células estimuladas para que expresen o contengan un polinucleótido recombinante, p. ej., un polinucleótido que codifica un receptor recombinante tal como un CAR; cultivar las células modificadas genéticamente hasta una cantidad, densidad o expansión umbral; formular las células cultivadas en una composición de salida; y criocongelar y conservar las células de salida formuladas hasta que las células se liberen para su infusión y/o administración a un sujeto. En algunos casos, el proceso se completa en un plazo de 19-23 días a partir de la obtención o recogida de la muestra biológica.

En algunos casos, los métodos divulgados se utilizan con relación a un proceso que genera una o más composiciones de linfocitos T enriquecidos, tal como de una única fuente, p. ej., una muestra biológica y/o composiciones de entrada aisladas, seleccionados o enriquecidos a partir de una muestra biológica. En casos particulares, la una o más composiciones de linfocitos T enriquecidos es o incluye una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos que contiene al menos un 80 % de linfocitos T CD4+ y al menos un 50 % de linfocitos T CD4+ que expresan el receptor recombinante. En algunos casos, casos, la una o más composiciones de linfocitos T enriquecidos incluye una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos y una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos que contienen al menos un 80 % de linfocitos T CD8+ y al menos un 50 % de linfocitos T CD8+ que expresan el receptor recombinante.

## II. PROTEÍNAS RECOMBINANTES

En algunos casos, las células tratadas, procesadas, modificadas genéticamente y/o producidas por los métodos divulgados en el presente documento contienen o expresan, o están modificadas genéticamente para contener o expresar, una proteína recombinante, tal como un receptor recombinante, p. ej., un receptor de antígeno quimérico (CAR), o un receptor de linfocitos T (TCR). En determinados casos, los métodos divulgados en el presente documento

producen y/o son capaces de producir células, o poblaciones o composiciones que contienen y/o están enriquecidas en células, que están modificadas genéticamente para expresar o contener una proteína recombinante. En algunos casos, los linfocitos T CD4+, o poblaciones o composiciones de linfocitos T CD4+, son tratadas, procesadas, modificadas genéticamente y/o producidas.

En algunos casos, las células incluyen uno o más ácidos nucleicos introducidos mediante modificación genética, y de ese modo expresan productos recombinantes o manipulados genéticamente de dichos ácidos nucleicos. En algunos casos, la transferencia de genes se logra estimulando primero las células, tal como mediante combinación con un estímulo que induce una respuesta tal como la proliferación, la supervivencia y/o la activación, p. ej., tal como se mide por la expresión de una citocina o un marcador de activación, seguido de la transducción de las células activadas y la expansión en cultivo hasta cantidades suficientes para aplicaciones clínicas.

Las células suelen expresar receptores recombinantes, tales como los receptores de antígeno, incluidos los receptores de antígeno funcionales no TCR, p. ej., receptores de antígeno quiméricos (CAR) y otros receptores de unión a antígeno, tales como los receptores transgénicos de linfocitos T (TCR). Entre los receptores también se encuentran otros receptores quiméricos

### I. Receptores de antígeno quiméricos

En algunos casos de los métodos y usos divulgados, los receptores quiméricos, tales como el receptor de antígeno quimérico, contienen uno o más dominios que combinan un dominio de unión a ligando (p. ej., anticuerpo o fragmento de anticuerpo) que proporciona especificidad para un antígeno deseado (p. ej., antígeno tumoral) con dominios de señalización intracelular. En algunos casos, el dominio de señalización intracelular es una porción de dominio intracelular activador, tal como un dominio activador de linfocitos T, que proporciona una señal de activación primaria. En algunos casos, el dominio de señalización intracelular contiene o contiene adicionalmente un dominio de señalización coestimulador para facilitar las funciones efectoras. En algunos casos, los receptores quiméricos, cuando se modifican genéticamente en las células inmunitarias, pueden modular la actividad de los linfocitos T, y, en algunos casos, pueden modular la diferenciación o la homeostasis de los linfocitos T, obteniéndose de este modo células modificadas genéticamente con mayor longevidad, supervivencia y/o persistencia *in vivo*, tal como para uso en métodos de terapia celular adoptiva.

Los receptores de antígeno ilustrativos, incluidos los CAR, y los métodos para modificar genéticamente e introducir dichos receptores en las células, incluyen los descritos, por ejemplo, en las publicaciones de solicitud de patente internacional número WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061, las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos número US2002131960, US2013287748, US20130149337, las patentes de los Estados Unidos N.º: 6451995, 7.446.190, 8.252.592, 8.339.645, 8.398.282, 7.446.179, 6.410.319, 7.070.995, 7.265.209, 7.354.762, 7.446.191, 8.324.353 y 8.479.118, y la solicitud de patente europea número EP2537416, y/o los descritos por Sadelain *et al.*, Cancer Discov. abril de 2013; 3(4): 388-398; Davila *et al.* (2013) PLoS ONE 8(4): e61338; Turtle *et al.*, Curr. Opin. Immunol., octubre de 2012; 24(5): 633-39; Wu *et al.*, Cancer, 18 de marzo de 2012 (2): 160-75. En algunos casos, los receptores de antígeno incluyen un CAR tal como se describe en la patente de Estados Unidos N.º: 7.446.190 y los descritos en la publicación de solicitud de patente internacional N.º: WO/2014055668 A1. Los ejemplos de los CAR incluyen CAR tal como se divulgan en cualquiera de las publicaciones mencionadas anteriormente, tal como WO2014031687, US 8339645, US 7446179, US 2013/0149337, patente de Estados Unidos N.º: 7446190, patente de Estados Unidos N.º: 8389282, Kochenderfer *et al.*, 2013, Nature Reviews Clinical Oncology, 10, 267-276 (2013); Wang *et al.* (2012) J. Immunother. 35(9): 689-701; y Brentjens *et al.*, Sci Transl Med. 2013 5(177). Véanse también los documentos WO2014031687, US 8339645, US 7446179, US 2013/0149337, patente de Estados Unidos N.º: 7.446.190 y patente de Estados Unidos N.º: 8.389.282.

Los receptores quiméricos, tales como los CAR, suelen incluir un dominio extracelular de unión a antígeno, tal como una porción de una molécula de anticuerpo, generalmente una región variable de cadena pesada (VH) y/o una región variable de cadena ligera (VL) del anticuerpo, p. ej., un fragmento de anticuerpo scFv.

En algunos casos, el antígeno al que se dirige el receptor es un polipéptido. En algunos casos, es un carbohidrato u otra molécula. En algunos casos, el antígeno se expresa o se sobreexpresa selectivamente en las células de la enfermedad o afección, p. ej., el tumor o las células patógenas, en comparación con células o tejidos normales o no diana. En otros casos, el antígeno se expresa en células normales y/o se expresa en células modificadas genéticamente.

En algunos casos, el antígeno es o incluye la integrina  $\alpha\text{v}\beta 6$  (integrina  $\alpha\text{v}\beta 6$ ), antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA), B7-H3, B7-H6, anhidrasa carbónica 9 (CA9, también conocida como CAIX o G250), un antígeno del cáncer de testículo, antígeno cáncer/testis 1B (CTAG, también conocido como NY-ESO-1 y LAGE-2), antígeno carcinoembrionario (CEA), una ciclina, ciclina A2, ligando 1 de quimiocinas (motivo C-C) (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, condroitín sulfato proteoglicano 4 (CSPG4), proteína del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), mutación del receptor del factor de crecimiento epidérmico de tipo III (EGFR VIII), glucoproteína 2 epitelial (EPG-2), glucoproteína 40 epitelial (EPG-40),

efrina B2, receptor de efrina A2 (EPHa2), receptor de estrógenos, receptor Fc de tipo 5 (FCRL5); también conocido como receptor Fc homólogo 5 o FCRH5), receptor de acetilcolina fetal (AChR fetal), una proteína fijadora de folato (FBP), receptor alfa de folato, gangliósido GD2, GD2 O-acetilado (OGD2), gangliósido GD3, glucoproteína 100 (gp100), glipicano-3 (GPC3), receptor 5D acoplado a proteína G (GPRC5D), Her2/neu (receptor tirosina quinasa erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), dímeros erbB, antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular humano (HMW-MAA), antígeno de superficie de la hepatitis B, antígeno leucocitario humano A1 (HLA-A1), antígeno leucocitario humano A2 (HLA-A2), receptor alfa de IL-22 (IL-22R $\alpha$ ), receptor IL-13 alfa 2 (IL-13R $\alpha$ 2), receptor del dominio de inserción de la quinasa (kdr), cadena ligera kappa, molécula de adhesión de células L1 (L1-CAM), epítipo CE7 de L1-CAM, miembro A de la familia 8 que contiene repeticiones ricas en leucina (LRRC8A), Lewis Y, antígeno asociado a melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, mesotelina (MSLN), c-Met, citomegalovirus murino (CMV), mucina 1 (MUC1), MUC16, ligandos de linfocitos citolíticos naturales, grupo 2, miembro D (NKG2D), melan A (MART-1), molécula de adhesión celular neural (NCAM), antígeno oncofetal, antígeno preferentemente expresado del melanoma (PRAME), receptor de progesterona, antígeno específico de próstata, antígeno de células madre de próstata (PSCA), antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), receptor huérano 1 similar al receptor tirosina quinasa (ROR1), survivina, glicoproteína del trofoblasto (TPBG también conocida como 5T4), glicoproteína 72 asociada a tumores (TAG72), proteína 1 relacionada con la tirosinasa (TRP1, también conocida como TYRP1 o gp75), proteína 2 relacionada con la tirosinasa (TRP2, también conocida como dopacromo tautomerasa, dopacromo delta-isomerasa o DCT), receptor del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR), receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2), tumor de Wilms 1 (WT-1), un antígeno específico de patógeno o expresado por patógeno, o un antígeno asociado con una etiqueta universal, y/o moléculas biotiniladas, y/o moléculas expresadas por VIH, VHC, VHB u otros patógenos. Los antígenos a los que se dirigen los receptores en algunos casos incluyen antígenos asociados con una neoplasia de linfocitos B, tal como cualquiera de una serie de marcadores de linfocitos B conocidos. En algunos casos, el antígeno es o incluye CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig kappa, Ig lambda, CD79a, CD79b o CD30.

En algunos casos, el antígeno es o incluye un antígeno específico de un patógeno o un antígeno expresado por un patógeno. En algunos casos, el antígeno es un antígeno vírico (tal como un antígeno vírico del VIH, VHC, VHB, etc.), antígenos bacterianos y/o antígenos parasitarios. Los antígenos a los que se dirigen los receptores en algunos casos incluyen antígenos asociados con una neoplasia de linfocitos B, tal como cualquiera de una serie de marcadores de linfocitos B conocidos. En algunos casos, el antígeno al que se dirige el receptor es el CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig kappa, Ig lambda, CD79a, CD79b o CD30.

En algunos casos, el antígeno o dominio de unión al antígeno es CD19. En algunos casos, el scFv contiene una VH y una VL derivadas de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo específico de CD19. En algunos casos, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a CD19 es un anticuerpo derivado de ratón tal como FMC63 y SJ25C1. En algunos casos, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es un anticuerpo humano, p. ej., como se describe en la publicación de patente de Estados Unidos n.º US 2016/0152723.

El término "anticuerpo" se usa en el presente documento en el sentido más amplio e incluye anticuerpos policlonales y monoclonales, incluyendo anticuerpos intactos y fragmentos de anticuerpos funcionales (de unión a antígeno), incluyendo fragmentos de unión a antígeno (Fab), fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos Fab', fragmentos Fv, fragmentos de IgG recombinante (rIgG), regiones variables de la cadena pesada (V<sub>H</sub>) capaces de unirse específicamente al antígeno, fragmentos de anticuerpos monocatenarios, incluyendo fragmentos variables monocatenarios (scFv) y anticuerpos de dominio único (p. ej., sdAb, sdFv, nanocuerpo). El término abarca formas de inmunoglobulinas modificadas genéticamente y/o de otro modo, tales como intracuerpos, peptidocuerpos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos completamente humanos, anticuerpos humanizados y anticuerpos heteroconjugados, anticuerpos multispecíficos, p. ej., biespecíficos o triespecíficos, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos, di-scFv en tándem, tri-scFv en tándem. A menos que se indique lo contrario, el término "anticuerpo" debe entenderse que engloba los fragmentos funcionales de anticuerpo de los mismos también denominados en el presente documento "fragmentos de unión a antígeno". El término también incluye anticuerpos intactos o de longitud completa, incluyendo anticuerpos de cualquier clase o subclase, incluyendo IgG y sus subclases, IgM, IgE, IgA e IgD.

Las expresiones "región determinante de la complementariedad" y "CDR", sinónimo de "región hipervariable" o "HVR", son conocidas en la técnica por referirse a secuencias no contiguas de aminoácidos dentro de regiones variables de anticuerpos, que confieren especificidad de antígeno y afinidad de unión. En general, hay tres CDR en cada región variable de cadena pesada (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) y tres CDR en cada región variable de cadena ligera (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3). Las "regiones marco" y "FR" se conocen en la técnica para referirse a las porciones que no son CDR de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera. En general, hay cuatro FR en cada región variable de cadena pesada de longitud completa (FR-H1, FR-H2, FR-H3 y FR-H4) y cuatro FR en cada región variable de cadena ligera de longitud completa (FR-L1, FR-L2, FR-L3 y FR-L4).

Los límites exactos de la secuencia de aminoácidos de una CDR o FR dada se pueden determinar fácilmente usando cualquiera de varios esquemas bien conocidos, entre los que se incluyen los descritos por Kabat *et al.* (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5.<sup>a</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (esquema de numeración "Kabat"); Al-Lazikani *et al.*, (1997) JMB 273,927-948 (esquema de numeración "Chothia"); MacCallum *et al.*, J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), "Antibody-antigen interactions: Contact

analysis and binding site topography", J. Mol. Biol. 262, 732-745". (Esquema de numeración "Contact"); Lefranc MP *et al.*, "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains", Dev Comp Immunol, Enero de 2003; 27(1):55-77 (esquema de numeración "IMGT"); Honegger A y Plückthun A, "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool", J Mol Biol, 8 de junio de 2001; 309(3):657-70, (esquema de numeración "Aho"); y Martin *et al.*, "Modeling antibody hypervariable loops: a combined algorithm", PNAS, 1989, 86(23):9268-9272, (esquema de numeración "AbM").

Los límites de una determinada CDR o FR pueden variar según el esquema utilizado para la identificación. Por ejemplo, el esquema de Kabat se basa en alineamientos estructurales, mientras que el esquema de Chothia se basa en información estructural. La numeración de los esquemas de Kabat y Chothia se basa en las longitudes de secuencia de las regiones de anticuerpos más comunes, con inserciones acomodadas por letras de inserción, por ejemplo, "30a", y deleciones que aparecen en algunos anticuerpos. Los dos esquemas colocan determinadas inserciones y deleciones ("indels") en diferentes posiciones, dando como resultado la numeración diferencial. El esquema Contact se basa en el análisis de estructuras cristalinas complejas y es similar en muchos aspectos al esquema de numeración de Chothia. El esquema AbM es un compromiso entre las definiciones de Kabat y Chothia basado en el utilizado por el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular.

La **Tabla 1**, a continuación, enumera los límites de posición ilustrativos de CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 y CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3 identificados mediante los esquemas de Kabat, Chothia, AbM y Contact, respectivamente. Para CDR-H1, la numeración de restos se enumera utilizando los esquemas de numeración de Kabat y Chothia. Las FR se encuentran entre las CDR, por ejemplo, con FR-L1 situada antes de CDR-L1, FR-L2 situada entre CDR-L1 y CDR-L2, FR-L3 situada entre CDR-L2 y CDR-L3, y así sucesivamente. Se observa que debido a que el esquema de numeración de Kabat que se muestra coloca inserciones en H35A y H35B, el final del bucle Chothia CDR-H1 cuando se numera utilizando la convención de numeración de Kabat que se muestra varía entre H32 y H34, dependiendo de la longitud del bucle.

**Tabla 1.** Límites de las CDR de acuerdo con diversos esquemas de numeración.

CDR	Kabat	Chothia	AbM	Contact
CDR-L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36
CDR-L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
CDR-L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96
CDR-H1 (numeración de Kabat <sup>1</sup> )	H31--H35B	H26--H32..34	H26--H35B	H30--H35B
CDR-H1 (Numeración de Chothia <sup>2</sup> )	H31--H35	H26--H32	H26--H35	H30--H35
CDR-H2	H50--H65	H52--H56	H50--H58	H47--H58
CDR-H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101
1 - Kabat <i>et al.</i> (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5. <sup>a</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD				
2 - Al-Lazikani <i>et al.</i> , (1997) JMB 273,927-948				

Por lo tanto, salvo que se indique lo contrario, una "CDR" o "región determinante de la complementariedad", o CDR específicas individuales (p. ej., "CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3), de un anticuerpo dado o región del mismo, tal como una región variable del mismo, debe entenderse que abarca una región determinante de la complementariedad (o la específica) definida por cualquiera de los esquemas mencionados anteriormente. Por ejemplo, cuando se indica que una CDR particular (p. ej., una CDR-H3) contiene la secuencia de aminoácidos de una CDR correspondiente en una secuencia de aminoácidos de V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub> dada, se entiende que dicha CDR tiene una secuencia de la CDR correspondiente (p. ej., CDR-H3) dentro de la región variable, tal como se define en cualquiera de los esquemas mencionados u otros esquemas conocidos. En algunos casos, se especifican secuencias de CDR específicas. Las secuencias CDR ilustrativas de los anticuerpos divulgados se describen utilizando varios esquemas de numeración, aunque se entiende que un anticuerpo divulgado puede incluir CDR como se describe de acuerdo con cualquiera de los otros esquemas de numeración mencionados u otros esquemas de numeración conocidos por un experto.

Análogamente, salvo que se indique lo contrario, una FR o una FR individual especificada (p. ej., FR-H1, FR-H2, FR-H3, FR-H4), de un anticuerpo dado o región del mismo, tal como una región variable del mismo, debe entenderse que abarca una región marco (o la específica) definida por cualquiera de los esquemas conocidos. En algunos casos, se especifica el esquema de identificación de una CDR, FR, o varias FR o CDR particulares, tal como la CDR definida por el método Kabat, Chothia, AbM o Contact, u otros esquemas conocidos. En otros casos, se proporciona la secuencia de aminoácidos particular de una CDR o FR.

La expresión "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo

- que está implicada en la unión del anticuerpo al antígeno. Las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera ( $V_H$  y  $V_L$ , respectivamente) de un anticuerpo natural tienen generalmente estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones marco conservadas (FR) y tres CDR. (Véase, p. ej., Kindt *et al.* Kuby Immunology, 6ª ed., W. H. Freeman y Co., página 91 (2007). Un solo dominio  $V_H$  o  $V_L$  puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Por otro lado, se pueden aislar anticuerpos que se unen a un antígeno particular usando un dominio  $V_H$  o  $V_L$  de un anticuerpo que se une al antígeno para efectuar una detección sistemática de una biblioteca de dominios  $V_L$  o  $V_H$  complementarios, respectivamente. Véase, p. ej., Portolano *et al.*, J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson *et al.*, Nature 352:624-628 (1991).
- Entre los anticuerpos incluidos en los CAR divulgados hay fragmentos de anticuerpo. Un "fragmento de anticuerpo" o "fragmento de unión a antígeno" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>; diacuerpos; anticuerpos lineales; regiones variables de la cadena pesada ( $V_H$ ), moléculas de anticuerpo de cadena sencilla, tal como los scFv y los anticuerpos de dominio único que comprenden únicamente la región  $V_H$ ; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. En algunos casos, el dominio de unión a antígeno en los CAR divulgados es o comprende un fragmento de anticuerpo que comprende una región de cadena pesada variable ( $V_H$ ) y una región de cadena ligera variable ( $V_L$ ). En casos particulares, los anticuerpos son fragmentos de anticuerpos de cadena sencilla que comprenden una región variable de cadena pesada ( $V_H$ ) y/o una región variable de cadena ligera ( $V_L$ ), tal como scFvs.
- En algunos casos, el scFv se deriva del FMC63. FMC63 se refiere generalmente a un anticuerpo monoclonal IgG1 de ratón obtenido contra células Nalm-1 y -16 que expresan CD19 de origen humano (Ling, N. R., *et al.* (1987). Leucocyte typing III. 302). En algunos casos, el anticuerpo FMC63 comprende CDRH1 y H2 establecidas en las SEQ ID NO: 38 y 39, respectivamente, y CDRH3 establecida en la SEQ ID NO: 40 o 54 y CDRL1 establecida en la SEQ ID NO: 35 y CDR L2 establecida en la SEQ ID NO: 36 o 55 y CDR L3 establecida en la SEQ ID NO: 37 o 34. En algunos casos, el anticuerpo FMC63 comprende la región variable de cadena pesada ( $V_H$ ) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41 y la región variable de cadena ligera ( $V_L$ ) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42.
- En algunos casos, el scFv comprende una cadena ligera variable que contiene la secuencia de CDRL1 de SEQ ID NO: 35, una secuencia de CDRL2 de SEQ ID NO: 36, y una secuencia de CDRL3 de SEQ ID NO: 37 y/o una cadena pesada variable que contiene una secuencia de CDRH1 de SEQ ID NO: 38, una secuencia de CDRH2 de SEQ ID NO: 39, y una secuencia de CDRH3 de SEQ ID NO: 40. En algunos casos, el scFv comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 41 y una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 42. En algunos casos, las cadenas pesada y ligera variables están unidas por un enlazador. En algunos casos, el enlazador es el establecido en la SEQ ID NO: 56. En algunos casos, el scFv comprende, en orden, una  $V_H$ , un enlazador, y una  $V_L$ . En algunos casos, el scFv comprende, en orden, una  $V_L$ , un enlazador, y una  $V_H$ . En algunos casos, el scFv está codificado por una secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO: 57 o una secuencia que presenta al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 57. En algunos casos, el scFv comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 43 o una secuencia que presenta al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 43.
- En algunos casos, el scFv se deriva de SJ25C1. SJ25C1 es un anticuerpo monoclonal IgG1 de ratón obtenido contra células Nalm-1 y -16 que expresan CD19 de origen humano (Ling, N. R., *et al.* (1987). Leucocyte typing III. 302). En algunos casos, el anticuerpo SJ25C1 comprende CDRH1, H2 y H3 establecidas en las SEQ ID NO: 47-49, respectivamente, y las secuencias CDRL1, L2 y L3 establecidas en las SEQ ID NO: 44-46, respectivamente. En algunos casos, el anticuerpo SJ25C1 comprende la región variable de cadena pesada ( $V_H$ ) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 50 y la región variable de cadena ligera ( $V_L$ ) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51.
- En algunos casos, el scFv comprende una cadena ligera variable que contiene la secuencia de CDRL1 de SEQ ID NO: 44, una secuencia de CDRL2 de SEQ ID NO: 45, y una secuencia de CDRL3 de SEQ ID NO: 46 y/o una cadena pesada variable que contiene una secuencia de CDRH1 de SEQ ID NO: 47, una secuencia de CDRH2 de SEQ ID NO: 48, y una secuencia de CDRH3 de SEQ ID NO: 49. En algunos casos, el scFv comprende una región variable de cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 50 y una región variable de cadena ligera establecida en la SEQ ID NO: 51. En algunos casos, la cadena pesada variable y la cadena ligera variable están unidas por un enlazador. En algunos casos, el enlazador es el establecido en la SEQ ID NO: 52. En algunos casos, el scFv comprende, en orden, una  $V_H$ , un enlazador, y una  $V_L$ . En algunos casos, el scFv comprende, en orden, una  $V_L$ , un enlazador, y una  $V_H$ . En algunos casos, el scFv comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 53 o una secuencia que presenta al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 53.
- En algunos casos, el antígeno o dominio de unión a antígeno es BCMA. En algunos casos, el scFv contiene una  $V_H$  y una  $V_L$  derivadas de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo específico de BCMA. En algunos casos, el

anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a BCMA es o contiene una VH y una VL de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo establecido en las solicitudes internacionales de patente, número de publicación WO 2016/090327 y WO 2016/090320.

5 En algunos casos, el antígeno o dominio de unión al antígeno es GPRC5D. En algunos casos, el scFv contiene una VH y una VL derivadas de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo específico de GPRC5D. En algunos casos, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a GPRC5D es o contiene una VH y una VL de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo establecido en las solicitudes internacionales de patente, número de publicación WO 2016/090329 y WO 2016/090312.

10 En algunos casos, el antígeno es CD20. En algunos casos, el scFv contiene una VH y una VL derivadas de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo específico de CD20. En algunos casos, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a CD20 es un anticuerpo que es o se deriva de rituximab, tal como el scFv de rituximab.

15 En algunos casos, el antígeno es CD22. En algunos casos, el scFv contiene una VH y una VL derivadas de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo específico de CD22. En algunos casos, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a CD22 es un anticuerpo que es o se deriva de m971, como es el scFv de m971.

20 En algunos casos, el receptor de antígeno quimérico incluye una porción extracelular que contiene un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. En algunos casos, el receptor de antígeno quimérico incluye una porción extracelular que contiene el anticuerpo o fragmento y un dominio de señalización intracelular. En algunos casos, el anticuerpo o fragmento incluye un scFv.

25 En algunos casos, la porción de anticuerpo del receptor recombinante, p. ej., CAR, incluye además al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, tal como una región de bisagra, p. ej., una región de bisagra de IgG4 y/o una región CH1/CL y/o Fc. En algunos casos, la región o porción constante es de una IgG humana, tal como IgG4 o IgG1. En algunos casos, la porción de la región constante sirve como una región espaciadora entre el componente de reconocimiento de antígeno, p. ej., scFv y dominio transmembrana. El espaciador puede tener una longitud que proporcione una mayor capacidad de respuesta de la célula después de la unión del antígeno, en comparación con en ausencia del espaciador. Los espaciadores ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, los descritos en Hudecek *et al.* (2013) Clin. Cancer Res., 19:3153, publicación de solicitud de patente internacional número WO2014031687, patente US-8.822.647 o solicitud publicada. n.º US2014/0271635.

35 En algunos casos, la región o porción constante es de una IgG humana, tal como IgG4 o IgG1. En algunos casos, el espaciador tiene la secuencia ESKYGPPCPPCP (establecida en la SEQ ID NO: 1), y está codificada por la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 2. En algunos casos, el espaciador tiene la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 3. En algunos casos, el espaciador tiene la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 4. En algunos casos, la región o porción constante es de IgD. En algunos casos, el espaciador tiene la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 5. En algunos casos, el espaciador tiene una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 4 o 5. En algunos casos, el espaciador tiene la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 25-33. En algunos casos, el espaciador tiene una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 25-33.

45 En algunos casos, el receptor de antígeno comprende un dominio intracelular unido directa o indirectamente al dominio extracelular. En algunos casos, el receptor de antígeno quimérico incluye un dominio transmembrana que une el dominio extracelular y el dominio de señalización intracelular. En algunos casos, el dominio de señalización intracelular comprende un ITAM. Por ejemplo, en algunos casos, el dominio de reconocimiento del antígeno (p. ej., el dominio extracelular) generalmente está unido a uno o más componentes de señalización intracelular, tales como componentes de señalización que imitan la activación a través de un complejo de receptor de antígeno, tal como un complejo TCR, en el caso de un CAR, y/o señal a través de otro receptor de superficie celular. En algunos casos, el receptor quimérico comprende un dominio transmembrana unido o fusionado entre el dominio extracelular (p. ej., scFv) y el dominio de señalización intracelular. Por lo tanto, en algunos casos, el componente de unión a antígeno (p. ej., anticuerpo) está unido a uno o más dominios de señalización transmembrana e intracelular.

50 En un caso, se usa un dominio transmembrana que se asocia de manera natural con uno de los dominios en el receptor, p. ej., CAR. En algunos casos, el dominio transmembrana se selecciona o se modifica mediante sustitución de aminoácidos para evitar la unión de dichos dominios a los dominios transmembrana de las mismas o diferentes proteínas de membrana de superficie para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor.

60 El dominio transmembrana en algunos casos deriva de una fuente natural o de una fuente sintética. Cuando la fuente es natural, el dominio en algunos casos deriva de cualquier proteína unida a la membrana o transmembrana. Las regiones transmembrana incluyen las derivadas de (es decir, comprenden al menos la región o regiones transmembrana de) la cadena alfa, beta o zeta del receptor de linfocitos T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. Como alternativa, el dominio



transmembrana en algunos casos es sintético. En algunos casos, el dominio transmembrana sintético comprende predominantemente restos hidrófobos tales como leucina y valina. En algunos casos, se encontrará un triplete de fenilalanina, triptófano y valina en cada extremo de un dominio transmembrana sintético. En algunos casos, el enlace es por enlazadores, espaciadores y/o dominio(s) transmembrana. En algunos casos, el dominio transmembrana contiene una porción transmembrana de CD28.

En algunos casos, el dominio extracelular y el dominio transmembrana se pueden unir directa o indirectamente. En algunos casos, el dominio extracelular y el transmembrana están unidos por un espaciador, tal como cualquiera descrito en el presente documento. En algunos casos, el receptor contiene la porción extracelular de la molécula de la que deriva el dominio transmembrana, tal como una porción extracelular de CD28.

Entre los dominios de señalización intracelular se encuentran aquellos que imitan o se aproximan a una señal a través de un receptor de antígeno natural, una señal a través de dicho receptor en combinación con un receptor coestimulador, y/o una señal a través de un receptor coestimulador solo. En algunos casos, un enlazador de oligopéptido o polipeptídico corto, por ejemplo, un enlazador de entre 2 y 10 aminoácidos de longitud, tal como uno que contiene glicinas y serinas, p. ej., doblete de glicina-serina, está presente y forma un enlace entre el dominio transmembrana y el dominio de señalización citoplasmática del CAR.

La activación de los linfocitos T se describe en algunos casos como mediada por dos clases de secuencias de señalización citoplasmática: las que inician la activación primaria dependiente de antígeno a través del TCR (secuencias de señalización citoplasmáticas primarias) y las que actúan de forma independiente del antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora (secuencias de señalización citoplasmáticas secundarias). En algunos casos, el CAR incluye uno o ambos componentes de señalización.

El receptor, p. ej., el CAR, incluye generalmente al menos un componente o componentes de señalización intracelular. En algunos casos, el CAR incluye una secuencia de señalización citoplasmática primaria que regula la activación primaria del complejo TCR. Las secuencias de señalización citoplasmáticas primarias que actúan de manera estimuladora pueden contener motivos de señalización que se conocen como motivos de activación del inmunorreceptor basados en tirosina o ITAM. Ejemplos de ITAM que contienen secuencias de señalización citoplasmáticas primarias incluyen las derivadas de la cadena zeta de CD3, gamma de FcR, gamma de CD3, delta de CD3 y épsilon de CD3. En algunos casos, la(s) molécula(s) de señalización citoplasmática en el CAR contiene(n) un dominio de señalización citoplasmática, porción del mismo, o secuencia derivada de la cadena zeta de CD3.

En algunos casos, el receptor incluye un componente intracelular de un complejo TCR, tal como una cadena CD3 de TCR que media la activación y citotoxicidad de los linfocitos T, p. ej., cadena zeta de CD3. Por lo tanto, en algunos casos, la porción de unión a antígeno se une a uno o más módulos de señalización celular. En algunos casos, los módulos de señalización celular incluyen el dominio transmembrana de CD3, los dominios de señalización intracelular de CD3 y/u otros dominios transmembrana de CD3. En algunos casos, el receptor, p. ej., CAR, incluye además una porción de una o más moléculas adicionales tales como el receptor Fc γ, CD8, CD4, CD25 o CD16. Por ejemplo, en algunos casos, el CAR u otro receptor quimérico incluye una molécula quimérica entre CD3-zeta (CD3-ζ) o el receptor Fc γ y CD8, CD4, CD25 o CD16.

En algunos casos, tras la ligación del CAR u otro receptor quimérico, el dominio citoplasmático o el dominio de señalización intracelular del receptor activa al menos una de las funciones efectoras normales o respuestas de la célula inmunitaria, p. ej., el linfocito T modificado genéticamente para expresar el CAR. Por ejemplo, en algunos contextos, el CAR induce una función de un linfocito T, tal como la actividad citolítica o la actividad de los linfocitos T colaboradores, tal como la secreción de citocinas u otros factores. En algunos casos, se usa una porción truncada de un dominio de señalización intracelular de un componente receptor de antígeno o molécula coestimuladora en lugar de una cadena inmunoestimuladora intacta, por ejemplo, si ésta transduce la señal de función efectora. En algunos casos, el dominio o dominios de señalización intracelular incluyen las secuencias citoplasmáticas del receptor de linfocitos T (TCR) y, en algunos casos, también las de los correceptores que en el contexto natural actúan en concierto con dichos receptores para iniciar la transducción de señales tras el acoplamiento del receptor de antígeno.

En el contexto de un TCR natural, la activación total generalmente requiere no solo la señalización a través del TCR, sino también una señal coestimuladora. Por lo tanto, en algunos casos, para promover la activación total, también se incluye en el CAR un componente para generar una señal secundaria o coestimuladora. En otros casos, el CAR no incluye un componente para generar una señal coestimuladora. En algunos casos, un CAR adicional se expresa en la misma célula y proporciona el componente para generar la señal secundaria o coestimuladora.

En algunos casos, el receptor de antígeno quimérico contiene un dominio intracelular de una molécula coestimuladora de linfocitos T. En algunos casos, el CAR incluye un dominio de señalización y/o una porción transmembrana de un receptor coestimulador, tal como CD28, 4-1BB, OX40, DAP10 recombinantes y ICOS. En algunos casos, el mismo CAR incluye tanto el componente activador como el coestimulador. En algunos casos, el receptor de antígeno quimérico contiene un dominio intracelular derivado de una molécula coestimuladora de linfocitos T o una variante funcional de la misma, tal como entre el dominio transmembrana y el dominio de señalización intracelular. En algunos casos, la molécula coestimuladora de linfocitos T es CD28 o 41BB.

En algunos casos, el dominio de activación está incluido dentro de un CAR, mientras que el componente coestimulador lo proporciona otro CAR que reconoce otro antígeno. En algunos casos, los CAR incluyen CAR activadores o

estimuladores, CAR coestimuladores, ambos expresados en la misma célula (véase el documento WO2014/055668). En algunos casos, las células incluyen uno o más CAR estimuladores o activadores y/o un CAR coestimulador. En algunos casos, las células incluyen además CAR inhibidores (iCARs, véase Fedorov *et al.*, Sci. Transl. Medicine, 5(215) (diciembre de 2013), tal como un CAR que reconoce un antígeno distinto del asociado y/o específico de la enfermedad o afección, en donde una señal activadora emitida a través del CAR dirigido a la enfermedad se ve disminuida o inhibida por la unión del CAR inhibidor a su ligando, p. ej., para reducir los efectos colaterales.

En algunos casos, los dos receptores inducen, respectivamente, una señal activadora y otra inhibidora a la célula, tal que la ligación de uno de los receptores a su antígeno activa la célula o induce una respuesta, pero la ligación del segundo receptor inhibidor a su antígeno induce una señal que suprime o amortigua esa respuesta. Algunos ejemplos son las combinaciones de CAR activadores y CAR inhibidores (iCAR). Se puede usar una estrategia de este tipo, por ejemplo, para reducir la probabilidad de efectos colaterales en el contexto en donde el CAR activador se une a un antígeno expresado en una enfermedad o afección pero que también se expresa en células normales, y el receptor inhibidor se une a un antígeno distinto que se expresa en las células normales pero no en las células de la enfermedad o afección.

En algunos casos, el receptor quimérico es o incluye un CAR inhibidor (p. ej., iCAR) e incluye componentes intracelulares que amortiguan o suprimen una respuesta inmunitaria, tal como una respuesta promovida por ITAM y/o coestimuladora en la célula. Ejemplos de tales componentes de señalización intracelular son los que se encuentran en las moléculas de puntos de control inmunitario, incluyendo PD-1, CTLA4, LAG3, BTLA, OX2R, TIM-3, TIGIT, LAIR-1, los receptores PGE2, los receptores de adenosina EP2/4, incluido A2AR. En algunos casos, la célula modificada genéticamente incluye un CAR inhibidor que incluye un dominio de señalización de o derivado de dicha molécula inhibidora, de tal forma que sirva para amortiguar la respuesta de la célula, por ejemplo, la inducida por un CAR activador y/o coestimulador.

En determinados casos, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio transmembrana de CD28 y un dominio de señalización unido a un dominio intracelular de CD3 (p. ej., CD3-zeta). En algunos casos, el dominio de señalización intracelular comprende dominios coestimuladores CD28 y CD137 (4-1BB, TNFRSF9) quiméricos, unidos a un dominio intracelular CD3 zeta.

En algunos casos, el CAR abarca uno o más, p. ej., dos o más, dominios coestimuladores y un dominio de activación, p. ej., un dominio de activación principal, en la porción citoplasmática. Los CAR ilustrativos incluyen componentes intracelulares de CD3-zeta, CD28 e 4-1BB.

En algunos casos, el receptor de antígeno incluye además un marcador y/o las células que expresan el CAR u otro receptor de antígeno incluyen además un marcador indirecto, tal como un marcador de superficie celular, que se puede usar para confirmar la transducción o la modificación genética de la célula para expresar el receptor. En algunos casos, el marcador incluye todo o parte (p. ej., forma truncada) de CD34, un NGFR, o receptor de factor de crecimiento epidérmico, tal como la versión truncada de dicho receptor de superficie celular (p. ej., tEGFR). En algunos casos, el ácido nucleico que codifica el marcador está operativamente unido a un polinucleótido que codifica una secuencia enlazadora, tal como una secuencia enlazadora escindible, p. ej., T2A. Por ejemplo, un marcador, y opcionalmente una secuencia enlazadora, puede ser cualquiera de los divulgados en la solicitud de patente publicada N.º WO2014031687. Por ejemplo, el marcador puede ser un EGFR truncado (tEGFR), es decir, opcionalmente, unido a una secuencia enlazadora, tal como una secuencia enlazadora escindible T2A.

Un polipéptido ilustrativo para un EGFR truncado (p. ej., tEGFR) comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 7 o 16 o una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7 o 16. Una secuencia de enlazador T2A ilustrativa comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 6 o 17 o una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6 o 17.

En algunos casos, el marcador es una molécula, p. ej., una proteína de la superficie celular, que no se encuentra naturalmente en los linfocitos T o no se encuentra naturalmente en la superficie de los linfocitos T, o una parte de los mismos. En algunos casos, la molécula es una molécula no propia, p. ej., una proteína no propia, es decir, una que no es reconocida como "propia" por el sistema inmunitario del hospedador al que se transferirán adoptivamente las células.

En algunos casos, el marcador no tiene ninguna función terapéutica y/o no produce ningún efecto que no sea el de ser utilizado como marcador para la modificación genética, p. ej., para seleccionar células modificadas genéticamente con éxito. En otros casos, el marcador puede ser una molécula terapéutica o una molécula que de otro modo ejerza algún efecto deseado, tal como un ligando para detectar una célula *in vivo*, tal como una molécula coestimuladora o del punto de control inmunitario para mejorar y/o atenuar las respuestas de las células tras la transferencia adoptiva y

el acoplamiento con el ligando.

En algunos casos, los CAR se denominan como CAR de primera, segunda y/o tercera generación. En algunos casos, un CAR de primera generación es uno que proporciona únicamente una señal inducida por la cadena de CD3 tras la unión del antígeno; en algunos casos, un CAR de segunda generación es aquel que proporciona dicha señal y señal coestimuladora, tal como uno que incluye un dominio de señalización intracelular de un receptor coestimulador tal como CD28 o CD137; en algunos casos, un CAR de tercera generación es uno que incluye múltiples dominios coestimuladores de diferentes receptores coestimuladores.

Por ejemplo, en algunos casos, el CAR contiene un anticuerpo, p. ej., un fragmento de anticuerpo, tal como un scFv, específico de un antígeno, incluido cualquiera de los descritos, un dominio transmembrana que es o contiene una porción transmembrana de CD28 o una variante funcional del mismo, y un dominio de señalización intracelular que contiene una porción de señalización de CD28 o una variante funcional del mismo y una porción de señalización de CD3 zeta o una variante funcional del mismo. En algunos casos, el CAR contiene un anticuerpo, p. ej., fragmento de anticuerpo, tal como un scFv, específico de un antígeno, incluido cualquiera de los descritos, un dominio transmembrana que es o contiene una porción transmembrana de CD28 o una variante funcional del mismo, y un dominio de señalización intracelular que contiene una porción de señalización de 4-1BB o una variante funcional del mismo y una porción de señalización de CD3 zeta o una variante funcional del mismo. En algunos de dichos casos, el receptor incluye además un espaciador que contiene una porción de una molécula de Ig, tal como una molécula de Ig humana, tal como una bisagra de Ig, p. ej., una bisagra de IgG4, tal como un espaciador solo de bisagra.

En algunos casos, el dominio transmembrana del receptor recombinante, p. ej., el CAR, es o incluye un dominio transmembrana de CD28 humano (p. ej., n.º de acceso P01747.1) o una variante del mismo, tal como un dominio transmembrana que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 8 o una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 8; en algunos casos, la porción que contiene el dominio transmembrana del receptor recombinante comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 9 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos o aproximadamente un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia con la misma.

En algunos casos, el componente o componentes de señalización intracelular del receptor recombinante, p. ej., el CAR, contiene un dominio de señalización coestimuladora intracelular de CD28 humano o una variante funcional o porción del mismo, tal como un dominio con una sustitución de LL a GG en las posiciones 186-187 de una proteína CD28 nativa. Por ejemplo, el dominio de señalización intracelular puede comprender la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 10 u 11 o una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10 u 11. En algunos casos, el dominio intracelular comprende un dominio de señalización coestimulador intracelular de 4-1BB (p. ej., número de acceso Q07011.1) o una variante funcional o parte del mismo, tal como la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 12 o una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 12.

En algunos casos, el dominio de señalización intracelular del receptor recombinante, p. ej., el CAR, comprende un dominio de señalización estimulador de CD3 zeta humano o una variante funcional del mismo, tal como un dominio citoplasmático de 112 AA de la isoforma 3 de CD3ζ humano (número de referencia: P20963.2) o un dominio de señalización CD3 zeta tal como se describe en la Patente US- 7.446.190 o la Patente US-8.911.993. Por ejemplo, en algunos casos, el dominio de señalización intracelular comprende la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NO: 13, 14 o 15 o una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 13, 14 o 15.

En algunos casos, el espaciador contiene solo una región de bisagra de una IgG, tal como solo una bisagra de IgG4 o IgG1, tal como solo el espaciador de bisagra establecido en la SEQ ID NO: 1. En otros casos, el espaciador es o contiene una bisagra de Ig, p. ej., una bisagra derivada de IgG4, opcionalmente unida a los dominios CH2 y/o CH3. En algunos casos, el espaciador es una bisagra de Ig, p. ej., una bisagra de IgG4, unida a los dominios CH2 y CH3, tal como se establece en la SEQ ID NO: 4. En algunos casos, el espaciador es una bisagra de Ig, p. ej., una bisagra de IgG4, unida a un dominio CH3 únicamente, tal como se establece en la SEQ ID NO: 3. En algunos casos, el espaciador es o comprende una secuencia rica en glicina-serina u otro enlazador flexible tal como los enlazadores flexibles conocidos.

Por ejemplo, en algunos casos, el CAR incluye un anticuerpo, tal como un fragmento de anticuerpo, incluidos los scFv, un espaciador, tal como un espaciador que contiene una parte de una molécula de inmunoglobulina, tal como una región de bisagra y/o una o más regiones constantes de una molécula de cadena pesada, tal como un espaciador que contiene una bisagra de Ig, un dominio transmembrana que contiene todo o parte de un dominio transmembrana derivado de CD28, un dominio de señalización intracelular derivado de CD28 y un dominio de señalización zeta de CD3. En algunos casos, el CAR incluye un anticuerpo o fragmento, tal como scFv, un espaciador tal como cualquiera

de los espaciadores que contienen una bisagra de Ig, un dominio transmembrana derivado de CD28, un dominio de señalización intracelular derivado de 4-1BB, y un dominio de señalización derivado de CD3 zeta.

Los marcadores indirectos ilustrativos pueden incluir formas truncadas de polipéptidos de la superficie celular, tales como las formas truncadas que no son funcionales y no transducen o no son capaces de transducir una señal o una señal transducida normalmente por la forma de longitud completa del polipéptido de superficie celular, y/o no se internalizan o no son capaces de internalizarse. Los polipéptidos de superficie celular truncados ilustrativos que incluyen formas truncadas de factores de crecimiento u otros receptores tales como un receptor truncado del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (tHER2), un receptor truncado del factor de crecimiento epidérmico (tEGFR, secuencia ilustrativa de tEGFR establecida en 7 o 16) o un antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) o una forma modificada del mismo. El tEGFR puede contener un epítipo reconocido por el anticuerpo cetuximab (Erbix®) u otro anticuerpo anti-EGFR terapéutico o molécula de unión, que pueden utilizarse para identificar o seleccionar células que han sido modificadas genéticamente para expresar la construcción tEGFR y una proteína exógena codificada, y/o para eliminar o separar células que expresan la proteína exógena codificada. Véanse, la patente US-8802374 y Liu *et al.*, Nature Biotech. abril de 2016; 34(4): 430-434). En algunos casos, el marcador, p. ej., marcador indirecto, incluye todo o parte (p. ej., forma truncada) de CD34, un NGFR, un CD19 o un CD19 truncado, p. ej., un CD19 no humano truncado, o un receptor del factor de crecimiento epidérmico (p. ej., tEGFR). En algunos casos, el marcador es o comprende una proteína fluorescente, tales como la proteína verde fluorescente (GFP), proteína fluorescente verde potenciada (EGFP), tal como la GFP superfolder (sfGFP), proteína roja fluorescente (RFP), tal como tdTomato, mCherry, mStrawberry, AsRed2, DsRed o DsRed2, proteína fluorescente cian (CFP), proteína fluorescente verde azulada (BFP), proteína fluorescente azul mejorada (EBFP), y proteína fluorescente amarilla (YFP), y sus variantes, incluidas las variantes de las especies, variantes monoméricas, y variantes optimizadas por codón y/o mejoradas de las proteínas fluorescentes. En algunos casos, el marcador es o comprende una enzima, tal como una luciferasa, el gen lacZ de *E. coli*, fosfatasa alcalina, fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP), cloranfenicol acetil transferasa (CAT). Algunos ejemplos de genes indicadores emisores de luz son la luciferasa (luc),  $\beta$ -galactosidasa, cloranfenicol acetiltransferasa (CAT),  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) o sus variantes.

En algunos casos, el marcador es un marcador de selección. En algunos casos, el marcador de selección es o comprende un polipéptido que confiere resistencia a agentes o fármacos exógenos. En algunos casos, el marcador de selección es un gen de resistencia a antibióticos. En algunos casos, el marcador de selección es un gen de resistencia a los antibióticos que confiere resistencia a los antibióticos a una célula de mamífero. En algunos casos, el marcador de selección es o comprende un gen de resistencia a la puomicina, un gen de resistencia a la higromicina, un gen de resistencia a la blastidina, un gen de resistencia a la neomicina, un gen de resistencia a la geneticina o un gen de resistencia a la zeocina o una forma modificada de los mismos.

En algunos casos, el ácido nucleico que codifica el marcador está operativamente unido a un polinucleótido que codifica una secuencia enlazadora, tal como una secuencia enlazadora escindible, p. ej., una T2A. Por ejemplo, un marcador, y opcionalmente una secuencia enlazadora, puede ser cualquiera de los descritos en el documento PCT Pub. n.º WO2014031687.

En algunos casos, las moléculas de ácido nucleico que codifican dichas construcciones CAR incluyen además una secuencia que codifica un elemento de salto ribosómico T2A y/o una secuencia tEGFR, p. ej., en dirección 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica el CAR. En algunos casos, la secuencia codifica un elemento de salto ribosómico T2A establecido en la SEQ ID NO: 6 o 17, o una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6 o 17.

En algunos casos, también pueden generarse linfocitos T que expresen un receptor de antígeno (p. ej., CAR) para expresar un EGFR truncado (EGFRt) como epítipo de selección no inmunogénico (p. ej., mediante la introducción de una construcción que codifique el CAR y el EGFRt separados por un interruptor ribosómico T2A para expresar dos proteínas de la misma construcción), que puede utilizarse como marcador para detectar dichas células (véase, por ejemplo, la patente US-8.802.374). En algunos casos, la secuencia codifica una secuencia tEGFR establecida en la SEQ ID NO: 7 o 16, o una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7 o 16. En algunos casos, el péptido, tal como T2A, puede hacer que el ribosoma se salte (salto ribosómico) la síntesis de un enlace peptídico en el C-terminal de un elemento 2A, dando lugar a una separación entre el final de la secuencia 2A y el siguiente péptido en dirección 3' (véase, por ejemplo, de Felipe. Genetic Vaccines and Ther. 2:13 (2004) y de Felipe *et al.* Traffic 5:616-626 (2004)). Se conocen muchos elementos de 2A. Ejemplos de secuencias 2A que pueden utilizarse en los métodos y ácidos nucleicos divulgados en el presente documento, sin limitación, secuencias 2A del virus de la fiebre aftosa (F2A, p. ej., SEQ ID NO: 21), virus de la rinitis equina A (E2A, p. ej., SEQ ID NO: 20), Virus Thosa asigna (T2A, p. ej., SEQ ID NO: 6 o 17), y teschovirus porcino 1 (P2A, p. ej., SEQ ID NO: 18 o 19) como se describe en la publicación de patente de EE.UU. n.º 20070116690.

Los receptores recombinantes, tales como los CAR, expresados por las células administradas al sujeto generalmente reconocen o se unen específicamente a una molécula que se expresa en, se asocia con y/o es específica de la enfermedad o afección o células de la misma que se están tratando. Tras la unión específica a la molécula, p. ej.,

antígeno, el receptor emite generalmente una señal inmunoestimuladora, tal como una señal inducida por ITAM, en la célula, promoviendo así una respuesta inmunitaria dirigida a la enfermedad o afección. Por ejemplo, en algunos casos, las células expresan un CAR que se une específicamente a un antígeno expresado por una célula o tejido de la enfermedad o afección o asociado a la enfermedad o afección.

## B. TCR

En algunos casos, se divulgan células manipuladas genéticamente, tales como linfocitos T, que expresan un receptor de linfocitos T (TCR) o una porción de unión a antígeno del mismo que reconoce un epítipo peptídico o un epítipo de linfocitos T de un polipéptido diana, tal como el antígeno de un tumor, proteína vírica o autoinmunitaria.

En algunos casos, un "receptor de linfocitos T" o "TCR" es una molécula que contiene cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  variables (también conocidas como TCR $\alpha$  y TCR $\beta$ , respectivamente) o cadenas  $\gamma$  y  $\delta$  variables (también conocidas como TCR $\gamma$  y TCR $\delta$ , respectivamente), o porciones de unión a antígeno del mismo, y que es capaz de unirse específicamente a un péptido unido a una molécula de MHC. En algunos casos, el TCR está en forma  $\alpha\beta$ . Normalmente, los TCR que existen en formas  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$  son generalmente estructuralmente similares, pero los linfocitos T que los expresan pueden tener distintas ubicaciones o funciones anatómicas. Un TCR se puede encontrar en la superficie de una célula o en forma soluble. Generalmente, un TCR se encuentra en la superficie de las células T (o linfocitos T) donde generalmente es responsable de reconocer los antígenos unidos a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC).

A menos que se indique lo contrario, debe entenderse que el término "TCR" abarca tanto los TCR completos como las porciones de unión a antígeno o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos. En algunos casos, el TCR es un TCR intacto o de longitud completa, incluyendo TCR en la forma  $\alpha\beta$  o  $\gamma\delta$ . En algunos casos, el TCR es una porción de unión al antígeno que es menor que un TCR completo pero que se une a un péptido específico unido en una molécula MHC, tal como la unión a un complejo MHC-péptido. En algunos casos, una porción o fragmento de unión a antígeno de un TCR puede contener sólo una parte de los dominios estructurales de un TCR completo o intacto, pero que sigue siendo capaz de unirse al epítipo peptídico, tal como el complejo MHC-péptido, al que se une el TCR completo. En algunos casos, una porción de unión a antígeno contiene los dominios variables de un TCR, tales como la cadena  $\alpha$  variable y la cadena  $\beta$  variable de un TCR, suficiente para formar un sitio de unión para unirse a un complejo MHC-péptido específico. Generalmente, las cadenas variables de un TCR contienen regiones determinantes de la complementariedad que intervienen en el reconocimiento del péptido, MHC y/o complejo MHC-péptido.

En algunos casos, los dominios variables del TCR contienen bucles hipervariables, o regiones determinantes de la complementariedad (CDR), que generalmente son los principales contribuyentes al reconocimiento del antígeno y a las capacidades de unión y especificidad. En algunos casos, una CDR de un TCR o una combinación de las mismas forma todo o sustancialmente todo el sitio de unión al antígeno de una molécula de TCR dada. Las distintas CDR de una región variable de una cadena TCR suelen estar separadas por regiones marco (FR), que generalmente muestran menos variabilidad entre las moléculas TCR en comparación con las CDR (véase, p. ej., Jores *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 87:9138, 1990; Chothia *et al.*, EMBO J. 7:3745, 1988; véase también Lefranc *et al.*, Dev. Comp. Immunol. 27: 55, 2003). En algunos casos, La CDR3 es la principal CDR responsable de la unión al antígeno o de la especificidad, o es la más importante entre las tres CDR de una región variable del TCR dada para el reconocimiento del antígeno, y/o para la interacción con la porción peptídica procesada del complejo péptido-MHC. En algunos contextos, la CDR1 de la cadena alfa puede interactuar con la parte N-terminal de ciertos péptidos antigénicos. En algunos contextos, la CDR1 de la cadena beta puede interactuar con la parte C-terminal del péptido. En algunos contextos, la CDR2 contribuye en mayor medida o es la principal CDR responsable de la interacción o el reconocimiento de la porción MHC del complejo MHC-péptido. En algunos casos, la región variable de la cadena  $\beta$  puede contener otra región hipervariable (CDR4 o HVR4), que generalmente interviene en la unión del superantígeno y no en el reconocimiento del antígeno (Kotb (1995) Clinical Microbiology Reviews, 8:411-426).

En algunos casos, un TCR también puede contener un dominio constante, un dominio transmembrana y/o una cola citoplasmática corta (véase, p. ej., Janeway *et al.*, Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 3ª Ed., Current Biology Publications, p. 4:33, 1997). En algunos casos, cada cadena del TCR puede poseer un dominio variable de inmunoglobulina en N-terminal, un dominio constante de inmunoglobulina, una región transmembrana y una cola citoplasmática corta en el extremo C-terminal. En algunos casos, un TCR se asocia con proteínas invariantes del complejo CD3 implicadas en la mediación de la transducción de señales.

En algunos casos, una cadena TCR contiene uno o más dominios constantes. Por ejemplo, la porción extracelular de una cadena TCR determinada (p. ej., cadena  $\alpha$  o cadena  $\beta$ ) puede contener dos dominios similares a inmunoglobulinas, tal como un dominio variable (p. ej., V $\alpha$  o V $\beta$ ; normalmente los aminoácidos 1 a 116 basado en la numeración de Kabat, Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 5ª ed.) y un dominio constante (p. ej., dominio constante de la cadena  $\alpha$  o C $\alpha$ , normalmente las posiciones 117 a 259 de la cadena basado en la numeración de Kabat o dominio constante de la cadena  $\beta$  o C $\beta$ , normalmente las posiciones 117 a 295 de la cadena según la numeración de Kabat) adyacente a la membrana celular. Por ejemplo, en algunos casos, la porción extracelular del TCR formada por las dos cadenas contiene dos dominios constantes proximales a la membrana y dos dominios variables distales a la membrana, cuyos dominios variables contienen cada uno CDR. El dominio constante del TCR

puede contener secuencias de conexión cortas en las que un resto de cisteína forma un enlace disulfuro, uniendo así las dos cadenas del TCR. En algunos casos, un TCR puede tener un resto de cisteína adicional en cada una de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ , de forma que el TCR contiene dos enlaces disulfuro en los dominios constantes.

5 En algunos casos, las cadenas de TCR contienen un dominio transmembrana. En algunos casos, el dominio transmembrana está cargado positivamente. En algunos casos, las cadenas de TCR contienen una cola citoplasmática. En algunos casos, la estructura permite al TCR asociarse con otras moléculas como CD3 y sus subunidades. Por ejemplo, un TCR que contiene dominios constantes con una región transmembrana puede anclar la proteína en la membrana celular y asociarse con subunidades invariantes del aparato o complejo de señalización de CD3. Las colas intracelulares de las subunidades de señalización de CD3 (p. ej., cadenas CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$  y CD3 $\zeta$ ) contienen uno o más motivos de activación del inmunorreceptor basados en tirosinas o ITAM que intervienen en la capacidad de señalización del complejo TCR.

10 En algunos casos, el TCR puede ser un heterodímero de dos cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  (u opcionalmente  $\gamma$  y  $\delta$ ) o puede ser una construcción de TCR de cadena sencilla. En algunos casos, el TCR es un heterodímero que contiene dos cadenas separadas (cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  o cadenas  $\gamma$  y  $\delta$ ) que están unidas, tal como por un enlace disulfuro o enlaces disulfuro.

15 En algunos casos, el TCR puede generarse a partir de una(s) secuencia(s) TCR conocida(s), tales como secuencias de cadenas V $\alpha$ , $\beta$ , para los que se dispone de una secuencia de codificación sustancialmente completa. Los métodos de obtención de secuencias de TCR de longitud completa, incluidas las secuencias de la cadena V, de fuentes celulares son bien conocidos. En algunos casos, los ácidos nucleicos que codifican el TCR pueden obtenerse de diversas fuentes, tales como mediante la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los ácidos nucleicos que codifican el TCR dentro de una célula o aislados de una célula o células dadas, o la síntesis de secuencias de ADN del TCR disponibles públicamente.

20 En algunos casos, el TCR se obtiene de una fuente biológica, tal como de células como de un linfocito T (p. ej., linfocito T citotóxico), hibridomas de linfocitos T u otra fuente pública disponible. En algunos casos, los linfocitos T pueden obtenerse a partir de células aisladas *in vivo*. En algunos casos, el TCR es un TCR seleccionado tímicamente. En algunos casos, el TCR es un TCR restringido al neoepítipo. En algunos casos, los linfocitos T pueden ser un hibridoma o clon de linfocitos T cultivados. En algunos casos, el TCR o la porción de unión a antígeno del mismo o el fragmento de unión a antígeno del mismo pueden generarse sintéticamente a partir del conocimiento de la secuencia del TCR.

25 En algunos casos, el TCR se genera a partir de un TCR identificado o seleccionado a partir del cribado de una biblioteca de TCR candidatos contra un antígeno polipéptido diana, o epítipo de linfocitos T diana del mismo. Las bibliotecas de TCR pueden generarse por amplificación del repertorio de V $\alpha$  y V $\beta$  de linfocitos T aislados de un sujeto, incluidas las células presentes en las CMSP, bazo u otro órgano linfoide. En algunos casos, los linfocitos T pueden amplificarse a partir de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL). En algunos casos, las bibliotecas de TCR pueden generarse a partir de linfocitos T CD4+ o CD8+. En algunos casos, los TCR pueden amplificarse a partir de una fuente de linfocitos T de un sujeto normal o sano, es decir, bibliotecas de TCR normales. En algunos casos, los TCR pueden amplificarse a partir de una fuente de linfocitos T de un sujeto enfermo, es decir, bibliotecas de TCR afectados. En algunos casos, se utilizan cebadores degenerados para amplificar el repertorio de genes de V $\alpha$  y V $\beta$ , tales como por RT-PCR en muestras, tales como linfocitos T, obtenidos de seres humanos. En algunos casos, las bibliotecas de scTv pueden ensamblarse a partir de bibliotecas de V $\alpha$  y V $\beta$  sin exposición previa en las que los productos amplificados se clonan o ensamblan para ser separados por un enlazador. Dependiendo de la fuente del sujeto y de las células, se clonan o ensamblan para ser separados por un enlazador. Dependiendo de la fuente del sujeto y de las células, las bibliotecas pueden ser específicas para cada alelo HLA. De manera alternativa, en algunos casos, las bibliotecas de TCR pueden generarse por mutagénesis o diversificación de una molécula de TCR original o de andamio. En algunos casos, los TCR están sometidos a una evolución dirigida, tal como por mutagénesis, p. ej., de la cadena  $\alpha$  o  $\beta$ . En algunos casos, se alteran determinados restos dentro de las CDR del TCR. En algunos casos, los TCR seleccionados pueden modificarse mediante maduración por afinidad. En algunos casos, pueden seleccionarse linfocitos T específicos de antígeno, tal como mediante un cribado para evaluar la actividad CTL contra el péptido. En algunos casos, los TCR, p. ej., presentes en los linfocitos T específicos de antígeno, pueden seleccionarse, tal como por la actividad de unión, p. ej., especial afinidad o avidez por el antígeno.

35 En algunos casos, el TCR o la porción de unión a antígeno del mismo es uno que ha sido modificado o modificado genéticamente. En algunos casos, se utilizan métodos de evolución dirigida para generar TCR con propiedades alteradas, tal como con una mayor afinidad por un complejo MHC-péptido específico. En algunos casos, la evolución dirigida se consigue mediante métodos de presentación que incluyen, pero sin limitación, presentación en levaduras (Holler *et al.* (2003) Nat Immunol, 4, 55-62; Holler *et al.* (2000) Proc Natl Acad Sci U S A, 97, 5387-92), presentación en fagos (Li *et al.* (2005) Nat Biotechnol, 23, 349-54), o presentación en linfocitos T (Chervin *et al.* (2008) J Immunol Methods, 339, 175-84). En algunos casos, los enfoques de presentación implican modificación genética o modificación de un TCR original o de referencia conocido. Por ejemplo, en algunos casos, un TCR de tipo silvestre puede utilizarse como molde para producir TCR mutagenizados en los que uno o más restos de las CDR están mutados, y se seleccionan mutantes con una propiedad alterada deseada, tal como una mayor afinidad por un antígeno diana deseado.

60 En algunos casos, los péptidos de un polipéptido diana para su uso en la producción o generación de un TCR de

interés son conocidos o pueden identificarse fácilmente. En algunos casos, los péptidos adecuados para su uso en la generación de TCR o porciones de unión a antígeno pueden determinarse basándose en la presencia de un motivo restringido por HLA en un polipéptido diana de interés, tal como un polipéptido diana descrito a continuación. En algunos casos, los péptidos se identifican utilizando los modelos informáticos de predicción disponibles. En algunos casos, para predecir los sitios de unión al MHC de clase I, dichos modelos incluyen, pero no se limitan a, ProPred1 (Singh and Raghava (2001) *Bioinformatics* 17(12):1236-1237 y SYFPEITHI (véase Schuler *et al.* (2007) *Immunoinformatics Methods in Molecular Biology*, 409(1): 75-93, 2007). En algunos casos, el epítipo restringido por el MHC es HLA-A0201, que se expresa en aproximadamente el 39-46 % de todos los caucásicos y, por tanto, representa una elección adecuada de antígeno MHC para su uso en la preparación de un TCR u otra molécula de unión a MHC-péptido.

Se conocen los motivos de unión del HLA-A0201 y los sitios de corte de los proteasomas e inmunoproteasomas mediante modelos informáticos de predicción. Para predecir los sitios de unión al MHC de clase I, dichos modelos incluyen, pero no se limitan a, ProPred1 (descrito con más detalle en Singh y Raghava, ProPred: predicción de sitios de unión HLA-DR. *BIOINFORMATICS* 17(12):1236-1237 2001), y SYFPEITHI (véase Schuler *et al.* SYFPEITHI, Database for Searching and T-Cell Epitope Prediction en *Immunoinformatics Methods in Molecular Biology*, vol 409(1): 75-93 2007)

En algunos casos, el TCR o la porción de unión a antígeno del mismo puede ser una proteína natural producida recombinantemente o una forma mutada de la misma en donde una o más propiedades, tal como la característica de unión, se ha alterado. En algunos casos, un TCR puede derivarse de una de varias especies animales, tal como un ser humano, ratón, rata u otros mamíferos. Un TCR puede estar unido a células o en forma soluble. En algunos casos, para los propósitos de los métodos divulgados, el TCR se encuentra en forma unida a la célula y se expresa en la superficie de una célula.

En algunos casos, el TCR es un TCR de longitud completa. En algunos casos, el TCR es una porción de unión a antígeno. En algunos casos, el TCR es un TCR dimérico (dTCR). En algunos casos, el TCR es un TCR de cadena sencilla (sc-TCR). En algunos casos, un dTCR o un scTCR tienen las estructuras descritas en los documentos WO 03/020763, WO 04/033685, WO2011/044186.

En algunos casos, el TCR contiene una secuencia correspondiente a la secuencia transmembrana. En algunos casos, el TCR contiene una secuencia correspondiente a secuencias citoplasmáticas. En algunos casos, el TCR es capaz de formar un complejo TCR con CD3. En algunos casos, cualquiera de los TCR, incluyendo un dTCR o un scTCR, pueden unirse a dominios de señalización que dan lugar a un TCR activo en la superficie de un linfocito T. En algunos casos, el TCR se expresa en la superficie de las células.

En algunos casos un dTCR contiene un primer polipéptido en donde una secuencia correspondiente a una secuencia de la región variable de la cadena  $\alpha$  del TCR está fusionada al extremo N de una secuencia correspondiente a una secuencia extracelular de la región constante de la cadena  $\alpha$  del TCR, y un segundo polipéptido en donde una secuencia correspondiente a una secuencia de la región variable de la cadena  $\beta$  del TCR está fusionada al extremo N de una secuencia correspondiente a una secuencia extracelular de la región constante de la cadena  $\beta$  del TCR, estando el primer y segundo polipéptidos unidos por un enlace disulfuro. En algunos casos, el enlace puede corresponder al enlace disulfuro nativo entre cadenas presente en los TCR  $\alpha\beta$  diméricos nativos. En algunos casos, los enlaces disulfuro entre cadenas no están presentes en un TCR nativo. Por ejemplo, en algunos casos, una o más cisteínas pueden incorporarse a las secuencias extracelulares de la región constante del par de polipéptidos dTCR. En algunos casos, puede ser deseable tanto un enlace disulfuro nativo como uno no nativo. En algunos casos, el TCR contiene una secuencia transmembrana para anclarse a la membrana.

En algunos casos, un dTCR contiene una cadena  $\alpha$  del TCR con un dominio  $\alpha$  variable, un dominio  $\alpha$  constante y un primer motivo de dimerización unido al extremo C-terminal del dominio  $\alpha$  constante, y una cadena  $\beta$  del TCR que comprende un dominio  $\beta$  variable, un dominio  $\beta$  constante y un primer motivo de dimerización unido al extremo C-terminal del dominio  $\beta$  constante, en donde el primer y segundo motivos de dimerización interactúan fácilmente para formar un enlace covalente entre un aminoácido del primer motivo de dimerización y un aminoácido del segundo motivo de dimerización que une la cadena  $\alpha$  del TCR y la cadena  $\beta$  del TCR.

En algunos casos, el TCR es un scTCR. Normalmente, un scTCR puede generarse utilizando métodos conocidos, véase, p. ej., Soo Hoo, W. F. *et al.* PNAS (USA) 89, 4759 (1992); Wülfing, C. y Plückthun, A., J. Mol. Biol. 242, 655 (1994); Kurucz, I. *et al.* PNAS (USA) 90 3830 (1993); solicitudes PCT internacional publicadas números WO 96/13593, WO 96/18105, WO99/60120, WO99/18129, WO 03/020763, WO2011/044186; y Schlueter, C. J. *et al.* J. Mol. Biol. 256, 859 (1996). En algunos casos, un scTCR contiene un enlace disulfuro entre cadenas no nativo introducido para facilitar la asociación de las cadenas del TCR (véase, p. ej., la solicitud PCT internacional publicada n.º WO 03/020763). En algunos casos, un scTCR es un TCR truncado no unido por disulfuro en donde cremalleras de leucina heterólogas fusionadas a los extremos C del mismo facilitan la asociación de cadenas (véase, p. ej., la solicitud PCT internacional publicada n.º WO99/60120). En algunos casos, un scTCR contiene un dominio variable TCR $\alpha$  unido covalentemente a un dominio variable TCR $\beta$  mediante un enlazador peptídico (véase, p. ej., la solicitud PCT internacional publicada n.º WO99/18129).

En algunos casos, un scTCR contiene un primer segmento constituido por una secuencia de aminoácidos correspondiente a una región variable de la cadena  $\alpha$  del TCR, un segundo segmento constituido por una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia de la región variable de la cadena  $\beta$  del TCR fusionada al extremo N de una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena  $\beta$  del TCR, y una secuencia enlazadora que une el extremo C del primer segmento con el extremo N del segundo segmento.

En algunos casos, un scTCR contiene un primer segmento constituido por una secuencia de región variable de la cadena  $\alpha$  fusionada al extremo N de una secuencia de dominio constante extracelular de la cadena  $\alpha$ , y un segundo segmento constituido por una secuencia de región variable de la cadena  $\beta$  fusionada al extremo N de una secuencia transmembrana y constante extracelular de la cadena  $\beta$ , y, opcionalmente, una secuencia enlazadora que une el extremo C del primer segmento con el extremo N del segundo segmento.

En algunos casos, un scTCR contiene un primer segmento constituido por una secuencia de región variable de la cadena  $\beta$  del TCR fusionada al extremo N de una secuencia de dominio constante extracelular de la cadena  $\beta$ , y un segundo segmento constituido por una secuencia de región variable de la cadena  $\alpha$  fusionada al extremo N de una secuencia transmembrana constante extracelular de la cadena  $\alpha$ , y, opcionalmente, una secuencia enlazadora que une el extremo C del primer segmento con el extremo N del segundo segmento.

En algunos casos, el enlazador de un scTCR que une el primer y segundo segmentos del TCR puede ser cualquier enlazador capaz de formar una única cadena polipeptídica, conservando la especificidad de unión al TCR. En algunos casos, la secuencia del enlazador puede, por ejemplo, tener la fórmula -P-AA-P- en donde P es prolina y AA representa una secuencia de aminoácidos en donde los aminoácidos son glicina y serina. En algunos casos, el primer y segundo segmentos están emparejados de modo que sus secuencias de región variable están orientadas para dicha unión. Por consiguiente, en algunos casos, el enlazador tiene una longitud suficiente para abarcar la distancia entre el extremo C del primer segmento y el extremo N del segundo segmento, o viceversa, pero para que no sea demasiado largo para bloquear o reducir la unión del scTCR al ligando diana. En algunos casos, el enlazador puede contener de 10 a 45 aminoácidos o de aproximadamente 10 a aproximadamente 45 aminoácidos, tal como de 10 a 30 aminoácidos o de 26 a 41 restos de aminoácidos, por ejemplo, 29, 30, 31 o 32 aminoácidos. En algunos casos, el enlazador tiene la fórmula -PGGG-(SGGGG)5-P- en donde P es prolina, G es glicina y S es serina (SEQ ID NO: 28). En algunos casos, el enlazador tiene la secuencia GSADDAKKDAKKDGKS (SEQ ID NO: 29).

En algunos casos, el scTCR contiene un enlace disulfuro covalente que une un resto de la región de inmunoglobulina del dominio constante de la cadena  $\alpha$  con un resto de la región de inmunoglobulina del dominio constante de la cadena  $\beta$ . En algunos casos, el enlace disulfuro entre cadenas en un TCR nativo no está presente. Por ejemplo, en algunos casos, una o más cisteínas pueden incorporarse a las secuencias extracelulares de la región constante del primer y segundo segmentos del polipéptido scTCR. En algunos casos, puede ser deseable tanto un enlace disulfuro nativo como uno no nativo.

En algunos casos de un dTCR o scTCR que contiene enlaces disulfuro entre cadenas introducidos, los enlaces disulfuro nativos no están presentes. En algunos casos, la una o más de las cisteínas nativas que forman un enlace disulfuro nativo entre cadenas se sustituyen por otro resto, tal como por una serina o alanina. En algunos casos, puede formarse un enlace disulfuro introducido mutando restos no cisteína en el primer y segundo segmentos a cisteína. Los enlaces disulfuro no nativos ilustrativos de un TCR se describen en la solicitud PCT internacional publicada n.º WO2006/000830.

En algunos casos, el TCR o fragmento de unión a antígeno del mismo presenta una afinidad con una constante de unión de equilibrio para un antígeno diana de entre o aproximadamente 10<sup>-5</sup> y 10<sup>-12</sup> M y todos los valores individuales e intervalos de los mismos. En algunos casos, el antígeno diana es un complejo MHC-péptido o ligando.

En algunos casos, el ácido nucleico o ácidos nucleicos que codifican un TCR, tal como las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ , pueden amplificarse mediante PCR, clonación u otros medios adecuados y clonarse en un vector o vectores de expresión adecuados. El vector de expresión puede ser cualquier vector de expresión recombinante adecuado, y puede utilizarse para transformar o transfectar cualquier hospedador adecuado. Los vectores adecuados incluyen aquellos diseñados para la propagación y expansión o para la expresión o ambas, tales como plásmidos y virus.

En algunos casos, el vector puede ser un vector de la serie pUC (Fermentas Life Sciences), la serie pBluescript (Stratagene, LaJolla, Calif.), la serie pET (Novagen, Madison, Wis.), la serie pGEX (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia), o la serie pEX (Clontech, Palo Alto, Calif.). En algunos casos, vectores bacteriófagos, tal como  $\lambda$ G10,  $\lambda$ GT11,  $\lambda$ ZapII (Stratagene),  $\lambda$ EMBL4 y  $\lambda$ NM1149, también puede utilizarse. En algunos casos, se pueden utilizar vectores de expresión vegetal e incluyen pBI01, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 y pBIN19 (Clontech). En algunos casos, los vectores de expresión animal incluyen pEUK-CI, pMAM y pMAMneo (Clontech). En algunos casos, se utiliza un vector vírico, tal como un vector retrovírico.

En algunos casos, los vectores de expresión recombinantes pueden prepararse mediante técnicas estándar de ADN



recombinante. En algunos casos, los vectores pueden contener secuencias reguladoras, tales como codones de inicio y de terminación de la transcripción y la traducción, que son específicos del tipo de hospedador (p. ej., bacteria, hongo, planta o animal) en donde se va a introducir el vector, según corresponda y teniendo en cuenta si el vector es de ADN o de ARN. En algunos casos, el vector puede contener un promotor no nativo operativamente unido a la secuencia de nucleótidos que codifica el TCR o la porción de unión a antígeno (u otra molécula de unión a MHC-péptido). En algunos casos, el promotor puede ser un promotor no vírico o un promotor vírico, tales como un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor de SV40, un promotor del RSV, y un promotor que se encuentra en la repetición terminal larga del virus murino de las células madre. También se contemplan otros promotores conocidos.

En algunos casos, para generar un vector que codifique un TCR, las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  se amplifican por PCR a partir de ADNc total aislado de un clon de linfocitos T que expresa el TCR de interés y se clonan en un vector de expresión. En algunos casos, las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  se clonan en el mismo vector. En algunos casos, las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  se clonan en vectores diferentes. En algunos casos, las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  generadas se incorporan a un vector retroviral, p. ej., lentiviral.

### III. MÉTODOS DE ADMINISTRACIÓN

En algunos casos, las composiciones de salida de linfocitos T enriquecidos, tales como composiciones de CD4+ y CD8 de salida separadas, producidas mediante los métodos divulgados, tal y como se establece en la Sección I, se administran como terapia celular, p. ej., una terapia celular adoptiva. En casos particulares, una o más composiciones de células, p. ej., las composiciones de células de salida descritas en el presente documento se administran como terapia celular. En algunos casos, se describen métodos de terapia adoptiva de linfocitos T, p. ej., en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º 2003/0170238 de Gruenberg et al; la patente US-4.690.915 de Rosenberg; Rosenberg (2011) Nat Rev Clin Oncol. 8(10):577-85). Véase, p. ej., Themeli et al. (2013) Nat Biotechnol. 31(10): 928-933; Tsukahara et al. (2013) Biochem Biophys Res Commun 438(1): 84-9; Davila et al. (2013) PLoS ONE 8(4): e61338.

En determinados casos, los métodos divulgados en el presente documento producen una única composición de linfocitos T enriquecidos de salida a partir de células de entrada aisladas, seleccionadas y/o enriquecidas a partir de una única muestra biológica que se administra como terapia celular. En casos particulares, la composición de salida única es una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos. En determinados casos, la composición de salida única es una composición de linfocitos T CD4+ y CD8+ enriquecidos. En algunos casos, los métodos divulgados en el presente documento producen dos o más composiciones de salida a partir de una única fuente, p. ej., una muestra biológica y/o composiciones de entrada aisladas, seleccionadas o enriquecidas a partir de una muestra biológica, que se administran a un sujeto. En algunos casos, las dos o más composiciones de salida se administran al sujeto por separado. En determinados casos, las dos o más composiciones de salida se combinan en una única composición y se administran al sujeto. En determinados casos, las dos o más composiciones de salida incluyen una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos de salida y una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos de salida.

En algunos casos, una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos de salida que se administra a un sujeto incluye al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 %, al menos un 99,9 %, o un o aproximadamente un 100 % de linfocitos T CD4+. En determinados casos, la composición de salida incluye al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 %, al menos un 99,9 %, o un o aproximadamente un 100 % de linfocitos T CD4+ que expresan el receptor recombinante y/o han sido transducidos o transfectados con el polinucleótido recombinante. En determinados casos, la composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos de salida que se administra al sujeto incluye menos del 40 %, menos del 35 %, menos del 30 %, menos del 25 %, menos del 20 %, menos del 15 %, menos del 10 %, menos del 5 %, menos del 1 %, menos del 0,1 %, o menos del 0,01 % de linfocitos T CD8+, y/o no contiene linfocitos T CD8+, y/o está exenta o sustancialmente exenta de linfocitos T CD8+.

En algunos casos, una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos de salida que se administra a un sujeto incluye al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 %, al menos un 99,9 %, o un o aproximadamente un 100 % de linfocitos T CD8+. En casos particulares, la composición incluye al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 %, al menos un 99,9 %, o un o aproximadamente un 100 % de linfocitos T CD8+ que expresan el receptor recombinante y/o han sido transducidos o transfectados con el polinucleótido recombinante. En determinados casos, la composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos de salida que se administra al sujeto incluye menos del 40 %, menos del 35 %, menos del 30 %, menos del 25 %, menos del 20 %, menos del 15 %, menos del 10 %, menos del 5 %, menos del 1 %, menos del 0,1 %, o menos del 0,01 % de linfocitos T CD4+, y/o no contiene linfocitos T CD4+, y/o está exenta o sustancialmente exenta de linfocitos T CD4+.

La enfermedad o afección tratada puede ser cualquiera en donde la expresión de un antígeno esté asociada y/o implicada en la etiología de una enfermedad o trastorno, p. ej., causa, agrava o está implicada de otro modo en dicha

enfermedad, afección o trastorno. Las enfermedades y afecciones ilustrativas pueden incluir enfermedades o afecciones asociadas con neoplasias malignas o transformación de células (p. ej., cáncer), enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria, o una enfermedad infecciosa, p. ej., causada por un patógeno bacteriano, vírico u otro patógeno. Antígenos ilustrativos, que incluyen antígenos asociados a diversas enfermedades y afecciones que pueden tratarse, se describen más arriba. En casos particulares, el receptor de antígeno quimérico o TCR transgénico se une específicamente a un antígeno asociado con la enfermedad o afección.

Entre las enfermedades, afecciones y trastornos se cuentan los tumores, incluyendo tumores sólidos, neoplasias hematológicas y melanomas, incluidos los tumores localizados y metastásicos, enfermedades infecciosas, tales como una infección por un virus u otro patógeno, p. ej., VIH, VHC, VHB, CMV, VPH, y enfermedades parasitarias, autoinmunitarias e inflamatorias. En algunos casos, la enfermedad, trastorno o afección es un tumor, cáncer, neoplasia maligna, neoplasia u otra enfermedad o trastorno proliferativo. Dichas enfermedades incluyen, pero sin limitación, leucemia, linfoma, p. ej., leucemia mieloide aguda (o mielógena) (LMA), leucemia mieloide crónica (o mielógena) (LMC), leucemia linfocítica aguda (o linfoblástica) (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), tricoleucemia (TCL), linfoma linfocítico de células pequeñas (LLCP), linfoma de células del manto (LCM), linfoma de la zona marginal, linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin (LH), linfoma no hodgkiniano (LNH), linfoma de células grandes anaplásicas (LPGA), linfoma folicular, linfoma folicular refractario, linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL) y mieloma múltiple (MM). En algunos casos, la enfermedad o afección es una neoplasia maligna de linfocitos B seleccionada de leucemia linfoblástica aguda (LLA), LAA de adulto, leucemia linfoblástica crónica (LLC), linfoma no hodgkiniano (LNH) y linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL). En algunos casos, la enfermedad o afección es LNH y el LNH se selecciona del grupo que consiste en LNH agresivo, linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL), NOS (de novo y transformada de indolente), linfoma mediastínico primario de linfocitos B grandes (LMPLB), linfoma de linfocitos B grandes rico en linfocitos T/histiocitos, linfoma de Burkitt, linfoma de células del manto (LCM) o linfoma folicular (LF), opcionalmente, linfoma folicular de grado 3B (LF3B).

En algunos casos, la enfermedad o afección es una enfermedad o afección infecciosa, tal como, pero sin limitación, infecciones víricas, retrovíricas, bacterianas y protozoarias, inmunodeficiencia, citomegalovirus (CMV), Virus de Epstein Barr (EBV), adenovirus, poliomavirus BK. En algunos casos, la enfermedad o afección es una enfermedad o afección autoinmunitaria o inflamatoria, tales como artritis, p. ej., artritis reumatoide (AR), diabetes de tipo I, lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, esclerodermia, enfermedad tiroidea autoinmunitaria, enfermedad de Graves, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, asma y/o una enfermedad o afección asociada al trasplante.

En algunos casos, el antígeno asociado a la enfermedad o trastorno se selecciona de  $\alpha\beta 6$  integrina (avb6 integrina), antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA), B7-H6, anhidrasa carbónica 9 (CA9, también conocida como CAIX o G250), un antígeno del cáncer de testículo, antígeno cáncer/testis 1B (CTAG, también conocido como NY-ESO-1 y LAGE-2), antígeno carcinoembrionario (CEA), una ciclina, ciclina A2, ligando 1 de quimiocinas (motivo C-C) (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD138, CD171, proteína del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), proteína truncada del factor de crecimiento epidérmico (tEGFR), mutación del receptor del factor de crecimiento epidérmico de tipo III (EGFR VIII), glucoproteína 2 epitelial (EPG-2), glucoproteína 40 epitelial (EPG-40), efrina B2, receptor de efrina A2 (EPHa2), receptor de estrógenos, receptor Fc de tipo 5 (FCRL5); también conocido como receptor Fc homólogo 5 o FCRH5), receptor de acetilcolina fetal (AChR fetal), una proteína fijadora de folato (FBP), receptor alfa de folato, receptor de acetilcolina fetal, gangliósido GD2, GD2 O-acetilado (OGD2), gangliósido GD3, glucoproteína 100 (gp100), receptor 5D acoplado a proteína G (GPCR5D), Her2/neu (receptor tirosina quinasa erbB2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), dímeros erbB, antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular humano (HMW-MAA), antígeno de superficie de la hepatitis B, antígeno leucocitario humano A1 (HLA-A1), antígeno leucocitario humano A2 (HLA-A2), receptor alfa de IL-22 (IL-22Ra), receptor IL-13 alfa 2 (IL-13Ra2), receptor del dominio de inserción de la quinasa (kdr), cadena ligera kappa, molécula de adhesión de células L1 (L1CAM), epítipo CE7 de L1-CAM, miembro A de la familia 8 que contiene repeticiones ricas en leucina (LRRC8A), Lewis Y, antígeno asociado a melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, mesotelina, c-Met, citomegalovirus murino (CMV), mucina 1 (MUC1), MUC16, ligandos de linfocitos citolíticos naturales, grupo 2, miembro D (NKG2D), melan A (MART-1), molécula de adhesión celular neural (NCAM), antígeno oncofetal, antígeno preferentemente expresado del melanoma (PRAME), receptor de progesterona, antígeno específico de próstata, antígeno de células madre de próstata (PSCA), antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), receptor huérfano 1 similar al receptor tirosina quinasa (ROR1), survivina, glicoproteína del trofoblasto (TPBG también conocida como 5T4), glicoproteína 72 asociada a tumores (TAG72), receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2), proteína del tumor de Wilms 1 (WT-1), un antígeno patógeno específico, o un antígeno asociado a una etiqueta universal, y/o moléculas biotiniladas, y/o moléculas expresadas por el VIH, VHC, VHB u otros patógenos. Los antígenos a los que se dirigen los receptores en algunos casos incluyen antígenos asociados con una neoplasia de linfocitos B, tal como cualquiera de una serie de marcadores de linfocitos B conocidos. En algunos casos, el antígeno al que se dirige el receptor es el CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig kappa, Ig lambda, CD79a, CD79b o CD30. En algunos casos, el antígeno es un antígeno específico del patógeno. En algunos casos, el antígeno es un antígeno vírico (tal como un antígeno vírico del VIH, VHC, VHB, etc.), antígenos bacterianos y/o antígenos parasitarios.

En algunos casos, la enfermedad o afección es una neoplasia de linfocitos B. En algunos casos, la neoplasia de

linfocitos B es una leucemia o un linfoma. En algunos casos, la enfermedad o afección es leucemia linfoblástica aguda (LLA), LAA de adulto, leucemia linfoblástica crónica (LLC), linfoma no hodgkiniano (LNH) o linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBGL). En algunos casos, la enfermedad o afección es LNH, tal como o incluido un LNH que es un LNH agresivo, linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBGL), NOS (de novo y transformada de indolente), linfoma mediastínico primario de linfocitos B grandes (LMPLB), linfoma de linfocitos B grandes rico en linfocitos T/histiocitos, linfoma de Burkitt, linfoma de células del manto (LCM) o linfoma folicular (LF), opcionalmente, linfoma folicular de grado 3B (LF3B). En algunos casos, el receptor recombinante, tal como un CAR, se une específicamente a un antígeno asociado a la enfermedad o afección o es expresado en células del entorno de una lesión asociada a la neoplasia de linfocitos B. Los antígenos a los que se dirigen los receptores en algunos casos incluyen antígenos asociados con una neoplasia de linfocitos B, tal como cualquiera de una serie de marcadores de linfocitos B conocidos. En algunos casos, el antígeno al que se dirige el receptor es el CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig kappa, Ig lambda, CD79a, CD79b o CD30, o combinaciones de los mismos.

En algunos casos, la enfermedad o afección es un mieloma, tal como un mieloma múltiple. En algunos casos, el receptor recombinante, tal como un CAR, se une específicamente a un antígeno asociado a la enfermedad o afección o es expresado en células del entorno de una lesión asociada al mieloma múltiple. En algunos casos, los antígenos a los que se dirigen los receptores incluyen antígenos asociados al mieloma múltiple. En algunos casos, el antígeno, p. ej., el segundo antígeno o antígeno adicional, tal como el antígeno específico de la enfermedad y/o el antígeno relacionado, se expresa en el mieloma múltiple, tal como el antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA), receptor acoplado a proteína G clase C grupo 5 miembro D (GPRC5D), CD38 (ADP ribosa hidrolasa cíclica), CD138 (sindecán-1), sindecán, SYN-1), CS-1 (CS1, subconjunto 1 de CD2, CRACC, SLAMF7, CD319 y 19A24), BAFF-R, TACI y/o FcRH5. Otros antígenos ilustrativos de mieloma múltiple incluyen CD56, TIM-3, CD33, CD123, CD44, CD20, CD40, CD74, CD200, EGFR, microglobulina  $\beta$ 2, HM1.24, IGF-1R, IL-6R, TRAIL-R1, y el receptor de activina tipo IIA (ActRIIA). Véase Benson y Byrd, *J. Clin. Oncol.* (2012) 30(16): 2013-15; Tao y Anderson, *Bone Marrow Research* (2011):924058; Chu *et al.*, *Leukemia* (2013) 28(4):917-27; Garfall *et al.*, *Discov Med.* (2014) 17(91):37-46. En algunos casos, los antígenos incluyen los presentes en los tumores linfoides, mieloma, linfoma asociado al SIDA, y/o linfoproliferaciones post-trasplante, tales como CD38. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos dirigidos contra dichos antígenos son conocidos e incluyen, por ejemplo, los descritos en las patentes US-8.153.765; US-8.603.477, US-8.008.450; la publicación de los EE.UU. N.º US20120189622 o US20100260748; y/o la publicación internacional PCT números WO2006099875, WO2009080829 o WO2012092612 o WO2014210064. En algunos casos, dichos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos (p. ej., scFv) están contenidos en anticuerpos multiespecíficos, receptores quiméricos multiespecíficos, tal como CAR multiespecíficos, y/o células multiespecíficas.

En algunos casos, el antígeno es un antígeno específico de un patógeno o un antígeno expresado por un patógeno. En algunos casos, el antígeno es un antígeno vírico (tal como un antígeno vírico del VIH, VHC, VHB, etc.), antígenos bacterianos y/o antígenos parasitarios.

En algunos casos, la terapia celular, p. ej., la terapia adoptiva de linfocitos T, se realiza mediante transferencia autóloga, en donde las células se aíslan y/o se preparan de otro modo a partir del sujeto que ha de recibir la terapia celular, o de una muestra derivada de un sujeto de este tipo. Por lo tanto, en algunos casos, las células derivan de un sujeto, p. ej., paciente, que necesita un tratamiento y las células, después del aislamiento y el procesamiento, se administran al mismo sujeto.

En algunos casos, la terapia celular, p. ej., la terapia adoptiva de linfocitos T, se realiza mediante transferencia alogéna, en donde las células se aíslan y/o preparan de otro modo a partir de un sujeto distinto de un sujeto que ha de recibir o que en última instancia recibe la terapia celular, p. ej., un primer sujeto. En dichos casos, las células después se administran a un sujeto diferente, p. ej., un segundo sujeto, de la misma especie. En algunos casos, los sujetos primero y segundo son genéticamente idénticos. En algunos casos, los sujetos primero y segundo son genéticamente similares. En algunos casos, el segundo sujeto expresa la misma clase o supertipo de HLA que el primer sujeto.

Las células, p. ej., células modificadas genéticamente generadas por un método descrito en el presente documento, tal como se describe en la Sección I, se pueden administrar por cualquier medio adecuado. En casos particulares, las células de dos o más composiciones de salida separadas, p. ej., composiciones de linfocitos T enriquecidos producidas por los métodos divulgados en el presente documento, tal como se describe en la Sección-I, se combinan en una única composición de células para ser administrada. En determinados casos, las células de distintas composiciones de salida se administran por separado al sujeto. En determinados casos, los linfocitos T CD4+ se administran por separado de los linfocitos T CD8+.

En algunos casos, las células pueden administrarse mediante infusión en bolo, mediante inyección, p. ej., inyecciones intravenosas o subcutáneas, inyección intraocular, inyección periocular, inyección subretiniana, inyección intravítrea, inyección transeptal, inyección subescleral, inyección intracoroidea, inyección intracameral, inyección subconjuntival, inyección subtenoniana, inyección retrobulbar, inyección peribulbar o administración yuxtapalpebral posterior. En algunos casos, se administran por vía parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para un tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. En algunos casos, se administra una dosis dada mediante una única administración en bolo de las células. En algunos casos, se administra mediante bolos múltiples de las células, por

ejemplo, durante un periodo no superior a 3 días, o mediante la administración de las células en infusión continua. En algunos casos, la administración de la dosis celular o de cualquier terapia adicional, p. ej., la terapia de linfosupresión, terapia de intervención y/o terapia combinada, se realiza mediante administración ambulatoria.

5 Para la prevención o el tratamiento de una enfermedad, la dosis apropiada puede depender del tipo de enfermedad que se vaya a tratar, el tipo de células o receptores recombinantes, de la gravedad y de la evolución de la enfermedad, de si las células se administran con fines preventivos o terapéuticos, de la terapia previa, de la historia clínica del sujeto y de la respuesta a las células y del criterio del médico responsable. En algunos casos, las composiciones y las células se administran de manera adecuada al sujeto de una vez o durante una serie de tratamientos.

10 En algunos casos, las células se administran como parte de un tratamiento combinado, tal como de manera simultánea o de manera secuencial con, en cualquier orden, otra intervención terapéutica, tal como un anticuerpo o célula o receptor o agente modificado genéticamente, tal como un agente citotóxico o terapéutico. En algunos casos, las células se coadministran con uno o más agentes terapéuticos adicionales o con relación a otra intervención terapéutica, ya sea simultáneamente o secuencialmente en cualquier orden. En algunos contextos, las células se coadministran con otra terapia lo suficientemente cercana en el tiempo como para que las poblaciones de células mejoren el efecto de uno o más agentes terapéuticos adicionales, o viceversa. En algunos casos, las células se administran antes que el uno o más agentes terapéuticos adicionales. En algunos casos, las células se administran después del uno o más agentes terapéuticos adicionales. En algunos casos, el uno o más agentes adicionales incluyen una citocina, tal como IL-2, por ejemplo, para mejorar la persistencia. En algunos casos, los métodos comprenden la administración de un agente quimioterapéutico.

En algunos casos, los métodos comprenden la administración de un agente quimioterapéutico, p. ej., un agente quimioterapéutico condicionante, por ejemplo, para reducir la carga tumoral antes de la administración.

25 En algunos casos, precondicionar a los sujetos con terapias inmunosupresoras (p. ej., linfosupresoras) puede mejorar los efectos de la terapia celular adoptiva (ACT).

30 Por lo tanto, en algunos casos, los métodos incluyen la administración de un agente precondicionador, tal como un agente linfosupresor o quimioterapéutico, tales como ciclofosfamida, fludarabina, o combinaciones de los mismos, a un sujeto antes del inicio de la terapia celular. Por ejemplo, se puede administrar al sujeto un agente precondicionador al menos 2 días antes, tal como al menos 3, 4, 5, 6 o 7 días antes, del inicio de la terapia celular. En algunos casos, al sujeto se le administra un agente precondicionador no más de 7 días antes, tal como no más de 6, 5, 4, 3 o 2 días antes, del inicio de la terapia celular.

35 En algunos casos, el sujeto se precondiciona con ciclofosfamida a una dosis comprendida entre o entre aproximadamente 20 mg/kg y 100 mg/kg, tal como entre o entre aproximadamente 40 mg/kg y 80 mg/kg. En algunos casos, el sujeto es precondicionado con o con aproximadamente 60 mg/kg de ciclofosfamida. En algunos casos, la ciclofosfamida puede administrarse en una dosis única o puede administrarse en una pluralidad de dosis, tal como la administración a diario, en días alternos o cada tres días. En algunos casos, la ciclofosfamida se administra una vez al día durante uno o dos días. En algunos casos, donde el agente linfodepresor comprende ciclofosfamida, al sujeto se le administra ciclofosfamida a una dosis comprendida entre o entre aproximadamente 100 mg/m<sup>2</sup> y 500 mg/m<sup>2</sup>, tal como entre o entre aproximadamente 200 mg/m<sup>2</sup> y 400 mg/m<sup>2</sup>, o 250 mg/m<sup>2</sup> y 350 mg/m<sup>2</sup>, ambos inclusive. En algunos casos, al sujeto se le administran unos 300 mg/m<sup>2</sup> de ciclofosfamida. En algunos casos, la ciclofosfamida puede administrarse en una dosis única o puede administrarse en una pluralidad de dosis, tal como la administración a diario, en días alternos o cada tres días. En algunos casos, la ciclofosfamida se administra diariamente, tal como durante 1-5 días, por ejemplo, durante 3 a 5 días. En algunos casos, al sujeto se le administran aproximadamente 300 mg/m<sup>2</sup> de ciclofosfamida, a diario durante 3 días, antes del inicio de la terapia celular.

50 En algunos casos, donde el agente linfosupresor comprende fludarabina, al sujeto se le administra fludarabina a una dosis comprendida entre o entre aproximadamente 1 mg/m<sup>2</sup> y 100 mg/m<sup>2</sup>, tal como entre o entre aproximadamente 10 mg/m<sup>2</sup> y 75 mg/m<sup>2</sup>, 15 mg/m<sup>2</sup> y 50 mg/m<sup>2</sup>, 20 mg/m<sup>2</sup> y 40 mg/m<sup>2</sup>, o 24 mg/m<sup>2</sup> y 35 mg/m<sup>2</sup>, ambos inclusive. En algunos casos, se administra al sujeto aproximadamente 30 mg/m<sup>2</sup> de fludarabina. En algunos casos, la fludarabina puede administrarse en una dosis única o puede administrarse en una pluralidad de dosis, tal como la administración a diario, en días alternos o cada tres días. En algunos casos, la fludarabina se administra diariamente, tal como durante 1-5 días, por ejemplo, durante 3 a 5 días. En algunos casos, se administra al sujeto aproximadamente 30 mg/m<sup>2</sup> de fludarabina, a diario durante 3 días, antes del inicio de la terapia celular.

60 En algunos casos, el agente linfosupresor comprende una combinación de agentes, tales como una combinación de ciclofosfamida y fludarabina. Por lo tanto, la combinación de agentes puede incluir ciclofosfamida en cualquier dosis o pauta de administración, tales como las descritas anteriormente, y fludarabina en cualquier dosis o pauta de administración, tales como las descritas anteriormente. Por ejemplo, en algunos casos, al sujeto se le administra 60 mg/kg (~2 g/m<sup>2</sup>) de ciclofosfamida y de 3 a 5 dosis de 25 mg/m<sup>2</sup> de fludarabina antes de la primera dosis o de la siguiente.

65 Después de la administración de las células, en algunos casos se mide la actividad biológica de las poblaciones de

células modificadas genéticamente, p. ej., mediante cualquiera de una serie de métodos conocidos. Los parámetros a evaluar incluyen la unión específica de un linfocito T natural o modificado genéticamente u otra célula inmunitaria al antígeno, *in vivo*, p. ej., mediante formación de imágenes, o *ex vivo*, p. ej., por ELISA o citometría de flujo. En determinados casos, la capacidad de las células modificadas genéticamente para destruir células diana puede medirse usando cualquier método adecuado conocido en la técnica, tal como ensayos de citotoxicidad descritos en, por ejemplo, Kochenderfer *et al.*, J. Immunotherapy, 32(7): 689-702 (2009) y Herman *et al.* J. Immunological Methods, 285(1): 25-40 (2004). En determinados casos, la actividad biológica de las células se mide sometiendo a ensayo la expresión y/o secreción de una o más citocinas, tal como CD107a, IFN $\gamma$ , IL-2 recombinantes y TNF. En algunos casos, la actividad biológica se mide evaluando el resultado clínico, tal como la reducción del tamaño o carga tumoral.

En determinados casos, las células modificadas genéticamente se modifican de diversas formas, de manera que se aumenta su eficacia terapéutica o profiláctica. Por ejemplo, el CAR o TCR modificado genéticamente expresado por la población puede conjugarse directa o indirectamente a través de un enlazador con un resto de direccionamiento. La práctica de conjugar compuestos, p. ej., el CAR o TCR, para dirigir restos es conocida. Véase, por ejemplo, Wadwa *et al.*, J. Drug Targeting 3: 1 1 1 (1995) y la patente US-5.087.616.

En algunos casos, se administra una dosis de células a los sujetos de acuerdo con los métodos divulgados, y/o con los artículos manufacturados o composiciones divulgados. En algunos casos, el tamaño o el momento de administración de las dosis se determina en función de la enfermedad o afección concreta del sujeto. En algunos casos, el tamaño o el momento de administración de las dosis para una enfermedad concreta a la vista de la descripción facilitada puede determinarse empíricamente.

En algunos casos, la dosis de células comprende entre o aproximadamente  $2 \times 10^5$  de las células/kg y o aproximadamente  $2 \times 10^6$  de las células/kg, tal como entre o aproximadamente  $4 \times 10^5$  de las células/kg y o aproximadamente  $1 \times 10^6$  de las células/kg o entre y o aproximadamente  $6 \times 10^5$  de las células/kg y o aproximadamente  $8 \times 10^5$  de las células/kg. En algunos casos, la dosis de células comprende no más de  $2 \times 10^5$  de las células (p. ej., las que expresan antígenos, tal como las células que expresan CAR) por kilogramo de peso corporal del sujeto (células/kg), tal como no más de o aproximadamente  $3 \times 10^5$  células/kg, no más de o aproximadamente  $4 \times 10^5$  células/kg, no más de o aproximadamente  $5 \times 10^5$  células/kg, no más de o aproximadamente  $6 \times 10^5$  células/kg, no más de o aproximadamente  $7 \times 10^5$  células/kg, no más de o aproximadamente  $8 \times 10^5$  células/kg, no más de o aproximadamente  $9 \times 10^5$  células/kg, no más de o aproximadamente  $1 \times 10^6$  células/kg, o no más de o aproximadamente  $2 \times 10^6$  células/kg. En algunos casos, la dosis de células comprende al menos o al menos aproximadamente o es de o aproximadamente  $2 \times 10^5$  de las células (p. ej., las que expresan antígenos, tal como las células que expresan CAR) por kilogramo de peso corporal del sujeto (células/kg), tal como al menos o al menos aproximadamente o es de o aproximadamente  $3 \times 10^5$  células/kg, al menos o al menos aproximadamente o es de o aproximadamente  $4 \times 10^5$  células/kg, al menos o al menos aproximadamente o es de o aproximadamente  $5 \times 10^5$  células/kg, al menos o al menos aproximadamente o es de o aproximadamente  $6 \times 10^5$  células/kg, al menos o al menos aproximadamente o es de o aproximadamente  $7 \times 10^5$  células/kg, al menos o al menos aproximadamente o es de o aproximadamente  $8 \times 10^5$  células/kg, al menos o al menos aproximadamente o es de o aproximadamente  $9 \times 10^5$  células/kg, al menos o al menos aproximadamente o es de o aproximadamente  $1 \times 10^6$  células/kg, o al menos o al menos aproximadamente o es de o aproximadamente  $2 \times 10^6$  células/kg.

En determinados casos, las células o poblaciones individuales de subtipos de células, se administran al sujeto en un intervalo de aproximadamente un millón a aproximadamente 100 mil millones de células y/o esa cantidad de células por kilogramo de peso corporal, tal como, p. ej., de 1 millón a aproximadamente 50 mil millones de células (p. ej., aproximadamente 5 millones de células, aproximadamente 25 millones de células, aproximadamente 500 millones de células, aproximadamente 1.000 millones de células, aproximadamente 5.000 millones de células, aproximadamente 20.000 millones de células, aproximadamente 30.000 millones de células, aproximadamente 40.000 millones de células o un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores anteriores), tal como de aproximadamente 10 millones a aproximadamente 100 mil millones de células (p. ej., aproximadamente 20 millones de células, aproximadamente 30 millones de células, aproximadamente 40 millones de células, aproximadamente 60 millones de células, aproximadamente 70 millones de células, aproximadamente 80 millones de células, aproximadamente 90 millones de células, aproximadamente 10.000 millones de células, aproximadamente 25.000 millones de células, aproximadamente 50.000 millones de células, aproximadamente 75.000 millones de células, aproximadamente 90.000 millones de células, o un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores anteriores) y, en algunos casos, de aproximadamente 100 millones de células a aproximadamente 50.000 millones de células (p. ej., aproximadamente 120 millones de células, aproximadamente 250 millones de células, aproximadamente 350 millones de células, aproximadamente 450 millones de células, aproximadamente 650 millones de células, aproximadamente 800 millones de células, aproximadamente 900 millones de células, aproximadamente 3.000 millones de células, aproximadamente 30.000 millones de células, aproximadamente 45.000 millones de células) o cualquier valor entre estos intervalos y/o por kilogramo de peso corporal. Las dosis pueden variar dependiendo de los atributos particulares de la enfermedad o trastorno y/o del paciente y/u otros tratamientos.

En algunos casos, la dosis de células es una dosis plana de células o una dosis fija de células, de modo que la dosis de células no está asociada ni basada en la superficie corporal o el peso del sujeto.

En algunos casos, la dosis de células modificadas genéticamente comprende de o de aproximadamente  $1 \times 10^5$  a  $5 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR, de  $1 \times 10^5$  a  $2,5 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR, de  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR, de  $1 \times 10^5$  a  $5 \times 10^7$  linfocitos T totales que expresan CAR, de  $1 \times 10^5$  a  $2,5 \times 10^7$  linfocitos T totales que expresan CAR, de  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^7$  linfocitos T totales que expresan CAR, de  $1 \times 10^5$  a  $5 \times 10^6$  linfocitos T totales que expresan CAR, de  $1 \times 10^5$  a  $2,5 \times 10^6$  linfocitos T totales que expresan CAR, de  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^6$  linfocitos T totales que expresan CAR, de  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR, de  $1 \times 10^6$  a  $2,5 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR, de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  linfocitos T totales que expresan CAR, de  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  linfocitos T totales que expresan CAR, de  $1 \times 10^6$  a  $2,5 \times 10^6$  linfocitos T totales que expresan CAR, de  $2,5 \times 10^6$  a  $5 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR, de  $2,5 \times 10^6$  a  $1 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR, de  $2,5 \times 10^6$  a  $5 \times 10^7$  linfocitos T totales que expresan CAR, de  $2,5 \times 10^6$  a  $2,5 \times 10^7$  linfocitos T totales que expresan CAR, de  $2,5 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  linfocitos T totales que expresan CAR, de  $2,5 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  linfocitos T totales que expresan CAR, de  $5 \times 10^6$  a  $5 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR, de  $5 \times 10^6$  a  $2,5 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR, de  $5 \times 10^6$  a  $1 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR, de  $5 \times 10^6$  a  $2,5 \times 10^7$  linfocitos T totales que expresan CAR, de  $5 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  linfocitos T totales que expresan CAR, de  $1 \times 10^7$  a  $5 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR, de  $1 \times 10^7$  a  $2,5 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR, de  $1 \times 10^7$  a  $1 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR, de  $1 \times 10^7$  a  $5 \times 10^7$  linfocitos T totales que expresan CAR, de  $1 \times 10^7$  a  $2,5 \times 10^7$  linfocitos T totales que expresan CAR, de  $2,5 \times 10^7$  a  $5 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR, de  $2,5 \times 10^7$  a  $2,5 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR, de  $2,5 \times 10^7$  a  $1 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR, de  $5 \times 10^7$  a  $5 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR, de  $5 \times 10^7$  a  $2,5 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR, de  $5 \times 10^7$  a  $1 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR, de  $1 \times 10^8$  a  $5 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR, de  $1 \times 10^8$  a  $2,5 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR, o de  $2,5 \times 10^8$  a  $5 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR.

En algunos casos, por ejemplo, donde el sujeto es un ser humano, la dosis incluye menos de aproximadamente  $1 \times 10^8$  células totales que expresan el receptor recombinante (p. ej., CAR), linfocitos T o células mononucleares de sangre periférica (CMSP), p. ej., en el intervalo de aproximadamente  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^8$  células de este tipo, tales como  $2 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ , o  $1 \times 10^8$  o el total de dichas células, o el intervalo entre dos de los valores anteriores. En algunos casos, donde el sujeto es un ser humano, la dosis incluye entre aproximadamente  $1 \times 10^6$  y  $3 \times 10^8$  células totales que expresan el receptor recombinante (p. ej., CAR), p. ej., en el intervalo de aproximadamente  $1 \times 10^7$  a  $2 \times 10^8$  células de este tipo, tales como un total de  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  o  $1,5 \times 10^8$  de dichas células, o el intervalo entre dos de los valores anteriores. En algunos casos, al paciente se le administran múltiples dosis, y cada una de las dosis o la dosis total puede estar dentro de cualquiera de los valores anteriores. En algunos casos, la dosis de células comprende la administración de  $1 \times 10^5$  a  $5 \times 10^8$  o de aproximadamente  $1 \times 10^5$  a aproximadamente  $5 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan el receptor recombinante o linfocitos T totales, de  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^8$  o de aproximadamente  $1 \times 10^5$  a aproximadamente  $1 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan el receptor recombinante o linfocitos T totales, de  $5 \times 10^5$  a  $1 \times 10^7$  o de aproximadamente  $5 \times 10^5$  a aproximadamente  $1 \times 10^7$  linfocitos T totales que expresan el receptor recombinante o linfocitos T totales, o de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  o de aproximadamente  $1 \times 10^6$  a aproximadamente  $1 \times 10^7$  linfocitos T totales que expresan el receptor recombinante o linfocitos T totales, cada uno inclusive.

En algunos casos, los linfocitos T de la dosis incluyen linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ o linfocitos T CD4+ y CD8+.

En algunos casos, por ejemplo, donde el sujeto es humano, los linfocitos T CD8+ de la dosis, incluidos en una dosis que incluya linfocitos T CD4+ y CD8+, incluye entre aproximadamente  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^8$  linfocitos CD8+ totales que expresan el receptor recombinante (p. ej., CAR), p. ej., en el intervalo de aproximadamente  $5 \times 10^6$  a  $1 \times 10^8$  células de este tipo,  $1 \times 10^7$ ,  $2,5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $7,5 \times 10^7$  o  $1 \times 10^8$  total de dichas células, o el intervalo entre dos de los valores anteriores. En algunos casos, al paciente se le administran múltiples dosis, y cada una de las dosis o la dosis total puede estar dentro de cualquiera de los valores anteriores. En algunos casos, la dosis de células comprende la administración de  $1 \times 10^7$  a  $0,75 \times 10^8$  o de aproximadamente  $1 \times 10^7$  a aproximadamente  $0,75 \times 10^8$  linfocitos T CD8+ totales que expresan el receptor recombinante, de  $1 \times 10^7$  a  $2,5 \times 10^7$  o de aproximadamente  $1 \times 10^7$  a aproximadamente  $2,5 \times 10^7$  linfocitos T CD8+ totales que expresan el receptor recombinante, de  $1 \times 10^7$  a  $0,75 \times 10^8$  o de aproximadamente  $1 \times 10^7$  a aproximadamente  $0,75 \times 10^8$  linfocitos T CD8+ totales que expresan el receptor recombinante, cada uno inclusive. En algunos casos, la dosis de células comprende la administración de o aproximadamente  $1 \times 10^7$ ,  $2,5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $7,5 \times 10^7$  o  $1 \times 10^8$  linfocitos T CD8+ totales que expresan el receptor recombinante.

En algunos casos, por ejemplo, donde el sujeto es humano, los linfocitos T CD4+ de la dosis, incluidos en una dosis que incluya linfocitos T CD4+ y CD8+, incluye entre aproximadamente  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^8$  linfocitos CD4+ totales que expresan el receptor recombinante (p. ej., CAR), p. ej., en el intervalo de aproximadamente  $5 \times 10^6$  a  $1 \times 10^8$  células de este tipo,  $1 \times 10^7$ ,  $2,5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $7,5 \times 10^7$  o  $1 \times 10^8$  total de dichas células, o el intervalo entre dos de los valores anteriores. En algunos casos, al paciente se le administran múltiples dosis, y cada una de las dosis o la dosis total puede estar dentro de cualquiera de los valores anteriores. En algunos casos, la dosis de células comprende la administración de  $1 \times 10^7$  a  $0,75 \times 10^8$  o de aproximadamente  $1 \times 10^7$  a aproximadamente  $0,75 \times 10^8$  linfocitos T CD4+ totales que expresan el receptor recombinante, de  $1 \times 10^7$  a  $2,5 \times 10^7$  o de aproximadamente  $1 \times 10^7$  a aproximadamente  $2,5 \times 10^7$  linfocitos T CD4+ totales que expresan el receptor recombinante, de  $1 \times 10^7$  a  $0,75 \times 10^8$

o de aproximadamente  $1 \times 10^7$  a aproximadamente  $0,75 \times 10^8$  linfocitos T CD4+ totales que expresan el receptor recombinante, cada uno inclusive. En algunos casos, la dosis de células comprende la administración de o aproximadamente  $1 \times 10^7$ ,  $2,5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $7,5 \times 10^7$  o  $1 \times 10^8$  linfocitos T CD4+ totales que expresan el receptor recombinante.

5 En algunos casos, la dosis de células, p. ej., linfocitos T que expresan el receptor recombinante, se administra al sujeto como dosis única o se administra una sola vez en un periodo de dos semanas, un mes, tres meses, seis meses, 1 año o más.

10 En el contexto de la terapia celular adoptiva, la administración de una "dosis" determinada abarca la administración de la cantidad o el número de células determinados como una única composición y/o una única administración ininterrumpida, p. ej., como una única inyección o infusión continua, y también abarca la administración de la cantidad o número determinado de células como una dosis dividida o como una pluralidad de composiciones, proporcionadas en múltiples composiciones individuales o infusiones, durante un periodo de tiempo especificado, tal como no más de 3 días. Por lo tanto, en algunos contextos, la dosis es una administración única o continua del número especificado de células, dada o iniciadas en un solo punto temporal individual. En algunos contextos, sin embargo, la dosis se administra en múltiples inyecciones o infusiones durante un periodo no superior a tres días, tal como una vez al día durante tres días o durante dos días, o mediante infusiones múltiples durante un periodo de un solo día.

20 Por lo tanto, en algunos casos, las células de la dosis se administran en una única composición farmacéutica. En algunos casos, las células de la dosis se administran en una pluralidad de composiciones, que contiene colectivamente las células de la dosis.

25 En algunos casos, la expresión "dosis fraccionada" se refiere a una dosis que se fracciona para que se administre en más de un día. Este tipo de posología se incluye en los presentes métodos y se considera una dosis única.

30 Por lo tanto, la dosis de células puede administrarse como una dosis dividida, p. ej., una dosis dividida administrada a lo largo del tiempo. Por ejemplo, en algunos casos, la dosis puede administrarse al sujeto durante 2 días o durante 3 días. Los métodos ilustrativos de dosificación dividida incluyen la administración del 25 % de la dosis el primer día y la administración del 75 % restante de la dosis el segundo día. En otros casos, el 33 % de la dosis puede administrarse el primer día y el 67 % restante administrarse el segundo día. En algunos casos, el 10 % de la dosis se administra el primer día, el 30 % de la dosis se administra el segundo día, y el 60 % de la dosis se administra el tercer día. En algunos casos, la dosis dividida no se reparte en más de 3 días.

35 En algunos casos, las células de la dosis pueden administrarse mediante la administración de una pluralidad de composiciones o soluciones, tales como una primera y una segunda, opcionalmente más, cada una de las cuales contiene algunas células de la dosis. En algunos casos, la pluralidad de composiciones, cada una de las cuales contiene una población y/o subtipos de células diferentes, se administran por separado o de forma independiente, opcionalmente dentro de un cierto periodo de tiempo. Por ejemplo, las poblaciones o subtipos de células pueden incluir linfocitos T CD8+ y CD4+, respectivamente, y/o poblaciones enriquecidas en CD8+ y CD4+, respectivamente, p. ej., linfocitos T CD4+ y/o CD8+, cada una de las cuales incluye individualmente células modificadas genéticamente para expresar el receptor recombinante. En algunos casos, la administración de la dosis comprende la administración de una primera composición que comprende una dosis de linfocitos T CD8+ o una dosis de linfocitos T CD4+ y la administración de una segunda composición que comprende la otra de la dosis de linfocitos T CD4+ y los linfocitos T CD8+.

40 En algunos casos, la administración de la composición o la dosis, p. ej., administración de la pluralidad de composiciones de células, implica la administración de las composiciones de células por separado. En algunos casos, las composiciones de células son composiciones de salida separadas producidas por los métodos divulgados, como se describe en la Sección I. En algunos casos, las distintas administraciones se llevan a cabo simultánea o secuencialmente, en cualquier orden. En algunos casos, la dosis comprende una primera composición y una segunda composición, y la primera composición y la segunda composición se administran con un intervalo de 0 a 12 horas, con un intervalo de 0 a 6 horas o de 0 a 2 horas. En algunos casos, el inicio de la administración de la primera composición y el inicio de la administración de la segunda composición se llevan a cabo en un intervalo de no más de 2 horas, no más de 1 hora o no más de 30 minutos, no más de 15 minutos, no más de 10 minutos o no más de 5 minutos. En algunos casos, el inicio y/o finalización de la administración de la primera composición y la finalización y/o inicio de la administración de la segunda composición se llevan a cabo en un intervalo de no más de 2 horas, no más de 1 hora o no más de 30 minutos, no más de 15 minutos, no más de 10 minutos o no más de 5 minutos.

50 En alguna composición, la primera composición, p. ej., primera composición de la dosis, comprende linfocitos T CD4+. En alguna composición, la primera composición, p. ej., primera composición de la dosis, comprende linfocitos T CD8+. En algunos casos, la primera composición se administra antes que la segunda composición.

60 En algunos casos, la dosis o composición de células incluye una proporción definida o diana entre linfocitos T CD4+ que expresan un receptor recombinante y linfocitos T CD8+ que expresan un receptor recombinante y/o entre linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+, cuya proporción es opcionalmente de aproximadamente 1:1 o está entre



aproximadamente 1:3 y aproximadamente 3:1, tal como aproximadamente 1:1. En algunos casos, la administración de una composición o dosis con la proporción diana o deseada de diferentes poblaciones celulares (tal como la proporción CD4+:CD8+ o la proporción CAR+CD4+:CAR+CD8+, p. ej., 1:1) implica la administración de una composición de células que contenga una de las poblaciones y, a continuación, la administración de otra composición de células que comprenda la otra de las poblaciones, donde la administración es o es aproximadamente la proporción diana o deseada. En algunos casos, la administración de una dosis o composición de células en una proporción definida conduce a una expansión, persistencia y/o actividad antitumoral mejorada de la terapia de linfocitos T.

En algunos casos, el sujeto recibe múltiples dosis, p. ej., dos o más dosis o múltiples dosis consecutivas, de las células.

En algunos casos, se administran dos dosis a un sujeto. En algunos casos, el sujeto recibe la dosis consecutiva, p. ej., la segunda dosis, se administra aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 días después de la primera dosis. En algunos casos, tras la primera dosis se administran varias dosis consecutivas, de forma que se administren una o más dosis adicionales tras la administración de la dosis consecutiva. En algunos casos, el número de células administradas al sujeto en la dosis adicional es igual o similar al de la primera dosis y/o dosis consecutiva. En algunos casos, la dosis o dosis adicionales son mayores que las dosis anteriores.

En algunos casos, el tamaño de la dosis primera y/o consecutiva se determina en función de uno o más criterios, como la respuesta del sujeto a un tratamiento previo, p. ej., quimioterapia, carga de enfermedad en el sujeto, tal como la carga tumoral, volumen, tamaño o grado, extensión o tipo de metástasis, estadio y/o probabilidad o incidencia de que el sujeto desarrolle resultados tóxicos, p. ej., SLC, síndrome de activación de macrófagos, síndrome de lisis tumoral, neurotoxicidad y/o una respuesta inmunitaria del hospedador contra las células y/o los receptores recombinantes administrados.

En algunos casos, el tiempo transcurrido entre la administración de la primera dosis y la administración de la dosis consecutiva es de aproximadamente 9 a aproximadamente 35 días, de aproximadamente 14 a aproximadamente 28 días, o de 15 a 27 días. En algunos casos, la administración de la dosis consecutiva se produce en un momento posterior a aproximadamente 14 días e inferior a aproximadamente 28 días después de la administración de la primera dosis. En algunos casos, el tiempo transcurrido entre la primera dosis y la consecutiva es de aproximadamente 21 días. En algunos casos, una o más dosis adicionales, p. ej., dosis consecutivas, se administran tras la administración de la dosis consecutiva. En algunos casos, la dosis o dosis consecutivas adicionales se administran al menos aproximadamente 14 y menos de aproximadamente 28 días después de la administración de una dosis previa. En algunos casos, la dosis adicional se administra menos de aproximadamente 14 días después de la dosis anterior, por ejemplo, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 días después de la dosis anterior. En algunos casos, ninguna dosis se administra menos de aproximadamente 14 días después de la dosis anterior y/o ninguna dosis se administra más de aproximadamente 28 días después de la dosis anterior.

En algunos casos, la dosis de células, p. ej., células que expresan el receptor recombinante, comprende dos dosis (p. ej., una dosis doble), que comprende una primera dosis de linfocitos T y una dosis consecutiva de linfocitos T, en donde una o ambas de la primera y la segunda dosis comprenden la administración de la dosis dividida de linfocitos T.

En algunos casos, la dosis de células suele ser lo suficientemente grande como para ser eficaz en la reducción de la carga de la enfermedad.

En algunos casos, las células se administran a una dosificación deseada, que en algunos casos incluye una dosis o un número deseado de células o uno o más tipos celulares y/o una proporción deseada de tipos celulares. Por lo tanto, la dosificación de células en algunos casos se basa en un número total de células (o número por kg de peso corporal) y una proporción deseada de las poblaciones individuales o subtipos, tales como la proporción entre CD4+ y CD8+. En algunos casos, la dosificación de células se basa en un número total deseado (o número por kg de peso corporal) de células en las poblaciones individuales o de tipos celulares individuales. En algunos casos, la dosificación se basa en una combinación de dichos rasgos distintivos, tales como un número deseado de células totales, proporción deseada y número total deseado de células en las poblaciones individuales.

En algunos casos, las poblaciones o subtipos de células, tales como linfocitos T CD8+ y CD4+, se administran en o dentro de una diferencia tolerada de una dosis deseada de células totales, tal como una dosis deseada de linfocitos T. En algunos casos, la dosis deseada es un número deseado de células o un número deseado de células por unidad de peso corporal del sujeto al que se le administran las células, p. ej., células/kg. En algunos casos, la dosis deseada es igual o superior a un número mínimo de células o al número mínimo de células por unidad de peso corporal. En algunos casos, entre las células totales, administradas a la dosis deseada, las poblaciones individuales o subtipos están presentes en una proporción de salida deseada (tal como una proporción entre CD4+ y CD8+) o próxima a ella, p. ej., dentro de una diferencia o un error tolerados determinados de una proporción de este tipo.

En algunos casos, las células se administran en o dentro de una diferencia tolerada de una dosis deseada de una o más de las poblaciones individuales o subtipos de células, tal como una dosis deseada de linfocitos T CD4+ y/o una dosis deseada de linfocitos T CD8+. En algunos casos, la dosis deseada es un número deseado de células del subtipo o población, o un número deseado de dichas células por unidad de peso corporal del sujeto al que se le administran



las células, p. ej., células/kg. En algunos casos, la dosis deseada es igual o superior a un número mínimo de células de la población o subtipo, o el número mínimo de células de la población o subtipo por unidad de peso corporal.

- 5 Por lo tanto, en algunos casos, la dosificación se basa en una dosis fija deseada de células totales y una proporción deseada, y/o se basa en una dosis fija deseada de uno o más, p. ej., de cada uno de los subtipos o subpoblaciones individuales. Por lo tanto, en algunos casos, la dosificación se basa en una dosis fija o mínima deseada de linfocitos T y una proporción deseada entre linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, y/o se basa en una dosis fija o mínima deseada de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y/o CD8<sup>+</sup>.
- 10 En algunos casos, las células se administran en o dentro de un intervalo tolerado de una proporción de salida deseada de múltiples poblaciones o subtipos celulares, tales como linfocitos T o subtipos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. En algunos casos, la proporción deseada puede ser una proporción específica o puede ser un intervalo de proporciones, por ejemplo, en algunos casos, la proporción deseada (p. ej., la proporción entre linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>) es entre o aproximadamente 5:1 y o aproximadamente 5:1 (o más de aproximadamente 1:5 y menos de aproximadamente 5:1), o es entre o aproximadamente 1:3 y o aproximadamente 3:1 (o más de aproximadamente 1:3 y menos de aproximadamente 3:1), tal como es entre o aproximadamente 2:1 y o aproximadamente 1:5 (o más de aproximadamente 1:5 y menos de aproximadamente 2:1, tal como o aproximadamente 5:1, 4,5:1, 4:1, 3,5:1, 3:1, 2,5:1, 2:1, 1,9:1, 1,8:1, 1,7:1, 1,6:1, 1,5:1, 1,4:1, 1,3:1, 1,2:1, 1,1:1, 1:1, 1:1,1, 1:1,2, 1:1,3, 1:1,4, 1:1,5, 1:1,6, 1:1,7, 1:1,8, 1:1,9, 1:2, 1:2,5, 1:3, 1:3,5, 1:4, 1:4,5 o 1:5. En algunos casos, la diferencia tolerada está dentro de aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 2
- 20 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 35 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 45 %, aproximadamente el 50 % de la proporción deseada, incluyendo cualquier valor entre estos intervalos. En determinados casos, las composiciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> enriquecidos y linfocitos T CD8<sup>+</sup> enriquecidos se combinan en la proporción deseada y se administran al sujeto como una única composición de células. En casos particulares, las composiciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> enriquecidos y linfocitos T CD8<sup>+</sup> enriquecidos se administran como composiciones separadas en la proporción deseada.
- 25 En casos particulares, los números y/o concentraciones de células se refieren al número de células que expresan el receptor recombinante (p. ej., CAR). En otros casos, los números y/o concentraciones de células se refieren al número o concentración de todas las células, linfocitos T o células mononucleares de sangre periférica (CMSP) administradas.
- 30 En algunos casos, el tamaño de la dosis se determina en función de uno o más criterios, tal como la respuesta del sujeto a un tratamiento previo, p. ej., quimioterapia, carga de enfermedad en el sujeto, tal como la carga tumoral, volumen, tamaño o grado, extensión o tipo de metástasis, estadio y/o probabilidad o incidencia de que el sujeto desarrolle resultados tóxicos, p. ej., SLC, síndrome de activación de macrófagos, síndrome de lisis tumoral, neurotoxicidad y/o una respuesta inmunitaria del hospedador contra las células y/o los receptores recombinantes administrados.
- 35 En algunos casos, los métodos también incluyen la administración de una o más dosis adicionales de células que expresan un receptor de antígeno quimérico (CAR) y/o terapia de linfo-supresión, y/o se repiten una o más etapas de los métodos. En algunos casos, la una o más dosis adicionales es la misma que la dosis inicial. En algunos casos, la una o más dosis adicionales son diferentes de la dosis inicial, p. ej., superior, tal como 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces o 10 veces o más superior a la dosis inicial, o inferior, tal como, p. ej., inferior, tal como 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces o 10 veces o más inferior a la dosis inicial. En algunos casos, la administración de una o más dosis adicionales se determina en función de la respuesta del sujeto al tratamiento inicial o a cualquier tratamiento previo, carga de enfermedad en el sujeto, tal como la carga tumoral, volumen, tamaño o grado, extensión o tipo de metástasis, estadio y/o probabilidad o incidencia de que el sujeto desarrolle resultados tóxicos, p. ej., SLC, síndrome de activación de macrófagos, síndrome de lisis tumoral, neurotoxicidad y/o una respuesta inmunitaria del hospedador contra las células y/o los receptores recombinantes administrados.
- 50

#### A. Respuesta, actividad y supervivencia

- 55 En algunos casos, las células, p. ej., las células de salida, producidas por los métodos divulgados en el presente documento, p. ej., tal como se describe en la Sección-I, se administran a un sujeto y se controla la respuesta, supervivencia, y/o signos o síntomas de toxicidad.
- 60 En algunos casos, al menos un 35 %, al menos un 40 % o al menos un 50 % de los sujetos tratados con composiciones de células, p. ej., composiciones de células terapéuticas que contienen linfocitos T CAR<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, alcanzan la remisión (RC); y/o al menos un 50 %, al menos un 60 % o al menos un 70 % de los sujetos tratados de acuerdo con el método alcanzan una tasa de respuesta objetiva (TRO). En algunos casos, al menos o aproximadamente al menos un 50 % de los sujetos, al menos o aproximadamente al menos un 60 % de los sujetos, al menos o aproximadamente al menos un 70 % de los sujetos, al menos o aproximadamente al menos un 80 % de los sujetos o al menos o aproximadamente al menos un 90 % de los sujetos tratados de acuerdo con el método alcanzan una RC y/o alcanzan una respuesta objetiva (RO). En algunos casos, los criterios evaluados para determinar la eficacia del tratamiento
- 65

incluyen la tasa de respuesta global (TRO), respuesta completa (RC), duración de la respuesta (DDR), supervivencia libre de progresión (SLP) y/o supervivencia global (SG).

En algunos casos, al menos el 40 % o al menos el 50 % de los sujetos tratados de acuerdo con los métodos divulgados en el presente documento alcanzan la remisión completa (RC), presentan una supervivencia libre de progresión (SLP) y/o una supervivencia global (SG) superior a 3 meses o aproximadamente, 6 meses o 12 meses; en promedio, los sujetos tratados de acuerdo con el método presentan una mediana de la SLP o SG superior a o aproximadamente 6 meses, 12 meses o 18 meses; y/o el sujeto presenta SLP o SG tras el tratamiento durante al menos 6, 12, 18 o más meses.

En algunos casos, las tasas de respuesta en los sujetos, tales como los sujetos con LNH, se basan en los criterios de Lugano. (Cheson *et al.*, (2014) JCO 32(27):3059-3067; Johnson *et al.*, (2015) Radiology 2:323-338; Cheson, B.D. (2015) Chin Clin Oncol 4(1):5). En algunos casos, la evaluación de la respuesta utiliza cualquiera de los métodos clínicos, hematológicos y/o moleculares. En algunos casos, la respuesta evaluada según los criterios de Lugano implica el uso de tomografía por emisión de positrones (PET)-tomografía computarizada (TC) y/o TC, según proceda. Las evaluaciones PET-CT pueden comprender además el uso de fluorodesoxiglucosa (FDG) para los linfomas ávidos de FDG. En algunos casos, cuando se utilice PET-TC para evaluar la respuesta en histologías ávidas de FDG, puede utilizarse una escala de 5 puntos. En algunos aspectos, la escala de 5 puntos comprende los siguientes criterios: 1, ninguna captación por encima del fondo; 2, captación  $\leq$  mediastino; 3, captación  $>$  mediastino pero  $\leq$  hígado; 4, captación moderada  $>$  hígado; 5, captación notablemente superior a la del hígado y/o lesiones nuevas; X, nuevas áreas de captación que probablemente no estén relacionadas con el linfoma.

En algunos casos, una respuesta completa, tal y como se describe utilizando los criterios de Lugano, implica una respuesta metabólica completa y una respuesta radiológica completa en varios puntos medibles. En algunos casos, estos sitios incluyen los ganglios linfáticos y los sitios extralinfáticos, en donde una RC se describe como una puntuación de 1, 2 o 3 con o sin masa residual en la escala de 5 puntos, cuando se utiliza PET-TC. En algunos casos, en el anillo de Waldeyer o en sitios extraganglionares con alta captación fisiológica o con activación en el bazo o la médula (p. ej., con quimioterapia o factores estimulantes de colonias mieloides), la captación puede ser mayor de lo normal en mediastino y/o hígado. En esta circunstancia, puede inferirse una respuesta metabólica completa si la captación en los sitios de afectación inicial no es superior a la del tejido normal circundante, aunque el tejido tenga una captación fisiológica elevada. En algunos casos, la respuesta se evalúa en los ganglios linfáticos mediante TC, en donde una RC se describe como la ausencia de focos extralinfáticos de enfermedad y los ganglios/masas ganglionares diana deben retroceder hasta  $\leq 1,5$  cm en el diámetro transversal más largo de una lesión (LDi). Otros lugares de evaluación incluyen la médula ósea, en donde la evaluación basada en PET-TC debe indicar la ausencia de evidencia de enfermedad ávida de FDG en la médula y una evaluación basada en TC debe indicar una morfología normal, que si es indeterminada debe ser IHC negativo. Otros lugares pueden incluir la evaluación del agrandamiento de los órganos, que debería volver a la normalidad. En algunos casos, se evalúan las lesiones no medidas y las lesiones nuevas, que en el caso de la RC debería estar ausente (Cheson *et al.*, (2014) JCO 32(27):3059-3067; Johnson *et al.*, (2015) Radiology 2:323-338; Cheson, B.D. (2015) Chin Clin Oncol 4(1):5).

En algunos casos, una respuesta parcial (RP; también conocida en algunos casos como remisión parcial), tal y como se describe utilizando los criterios de Lugano, implica una respuesta parcial metabólica y/o radiológica en varios puntos medibles. En algunos casos, estos sitios incluyen los ganglios linfáticos y los sitios extralinfáticos, en donde una RP se describe como una puntuación de 4 o 5 con una captación reducida en comparación con el valor basal y masa(s) residual(es) de cualquier tamaño, cuando se utiliza PET-TC. Entre tanto, tales hallazgos pueden indicar la respuesta de la enfermedad. Al final del tratamiento, tales hallazgos pueden indicar enfermedad residual. En algunos casos, la respuesta se evalúa en los ganglios linfáticos mediante TC, en donde una RP se describe como  $\geq 50$  % de disminución de la SPD de hasta 6 ganglios diana medibles y localizaciones extraganglionares. Si una lesión es demasiado pequeña para medirla con TC, se asigna 5 mm  $\times$  5 mm como valor por defecto; si la lesión ya no es visible, el valor es 0 mm  $\times$  0 mm; para un nodo  $> 5$  mm  $\times$  5 mm, pero más pequeño de lo normal, se utilizan para el cálculo mediciones reales. Otros lugares de evaluación incluyen la médula ósea, donde la evaluación basada en PET-TC debe indicar una captación residual superior a la captación en la médula normal, pero reducida en comparación con el valor basal (se permite captación difusa compatible con cambios reactivos de la quimioterapia). En algunos casos, si hay cambios focales persistentes en la médula en el contexto de una respuesta ganglionar, debe considerarse la posibilidad de realizar una evaluación adicional con RM o biopsia, o una gammagrafía de intervalo. En algunos casos, otros lugares pueden incluir la evaluación del agrandamiento de los órganos, donde en el bazo la regresión debe ser  $> 50$  % en longitud por encima de lo normal. En algunos casos, se evalúan las lesiones no medidas y las lesiones nuevas, que en el caso de la RP debería estar ausente/normal, regresión, pero sin aumento. La ausencia de respuesta/enfermedad estable (EE) o la enfermedad progresiva (EP) también pueden medirse mediante evaluaciones basadas en PET-TC y/o TC. (Cheson *et al.*, (2014) JCO 32(27):3059-3067; Johnson *et al.*, (2015) Radiology 2:323-338; Cheson, B.D. (2015) Chin Clin Oncol 4(1):5).

En algunos aspectos, la supervivencia libre de progresión (SLP) se describe como la duración durante y después del tratamiento de una enfermedad, tal como el cáncer, durante la cual un paciente convive con la enfermedad pero no empeora. En algunos casos, la respuesta objetiva (RO) se describe como una respuesta mensurable. En algunos casos, la tasa de respuesta objetiva (TRO) se describe como la proporción de pacientes que logran una RC o una RP.

En algunos casos, la supervivencia global (SG) se describe como el tiempo transcurrido desde la fecha del diagnóstico o el inicio del tratamiento de una enfermedad, tal como el cáncer, en el que los sujetos diagnosticados con la enfermedad siguen vivos. En algunos casos, la supervivencia libre de acontecimientos (SLA) se describe como el periodo de tiempo tras finalizar el tratamiento de un cáncer en donde el sujeto permanece no presenta determinadas complicaciones o acontecimientos que el tratamiento pretendía prevenir o retrasar. Estos acontecimientos pueden incluir la reaparición del cáncer o la aparición de determinados síntomas, tales como dolor óseo por un cáncer que se ha extendido al hueso, o la muerte.

En algunos casos, la medida de la duración de la respuesta (DDR) incluye el tiempo transcurrido desde la documentación de la respuesta tumoral hasta la progresión de la enfermedad. En algunos casos, el parámetro para evaluar la respuesta puede incluir la respuesta duradera, p. ej., respuesta que persiste tras un periodo de tiempo desde el inicio de la terapia. En algunos casos, la respuesta duradera viene indicada por la tasa de respuesta aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18 o 24 meses después del inicio del tratamiento. En algunos casos, la respuesta es duradera durante más de 3 meses o más de 6 meses.

En algunos casos, se utilizan los criterios RECIST para determinar la respuesta tumoral objetiva; en algunos casos, en tumores sólidos. (Eisenhauer *et al.*, European Journal of Cancer 45 (2009) 228-247.) En algunos casos, los criterios RECIST se utilizan para determinar la respuesta tumoral objetiva de las lesiones diana. En algunos aspectos, una respuesta completa determinada mediante los criterios RECIST se describe como la desaparición de todas las lesiones diana y cualquier ganglio linfático patológico (ya sea diana o no) debe tener una reducción en el eje corto a <10 mm. En otros casos, una respuesta parcial determinada según los criterios RECIST se describe como una disminución de al menos el 30 % en la suma de los diámetros de las lesiones diana, tomando como referencia la suma de los diámetros en el basal. En otros casos, la enfermedad progresiva (EP) se define como un aumento de al menos un 20 % en la suma de los diámetros de las lesiones diana, tomando como referencia la suma más pequeña del estudio (esto incluye si la suma en el basal es la más pequeña del estudio). Además del aumento relativo del 20 %, la suma también debe demostrar un aumento absoluto de al menos 5 mm (en algunos casos, la aparición de una o más lesiones nuevas también se considera progresión). En otros casos, la enfermedad estable (EE) se describe como ni una reducción suficiente para clasificarse como RP ni un aumento suficiente para calificarse como EP, tomando como referencia la suma más pequeña de los diámetros durante el estudio.

La carga de enfermedad puede abarcar un número total de células de la enfermedad en el sujeto o en un órgano, tejido o líquido corporal del sujeto, tal como el órgano o tejido del tumor u otra localización, p. ej., lo que indicaría metástasis. Por ejemplo, las células tumorales pueden detectarse y/o cuantificarse en la sangre o la médula ósea en el contexto de determinadas neoplasias hematológicas. La carga de morbilidad puede incluir, en algunos casos, la masa de un tumor, el número o la extensión de las metástasis y/o el porcentaje de blastos presentes en la médula ósea.

En algunos casos, un sujeto tiene leucemia. El alcance de la carga de la enfermedad puede determinarse mediante la evaluación de la leucemia residual en sangre o médula ósea.

En algunos casos, las tasas de respuesta en los sujetos, tales como los sujetos con LLC, se basan en los criterios de respuesta del International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (IWCLL) (Hallek, *et al.*, Blood 2008, Jun 15; 111(12): 5446-5456). En algunos casos, estos criterios se describen a continuación: remisión completa (RC; también conocida en algunos casos como respuesta completa), que en algunos casos requiere la ausencia de linfocitos clonales en sangre periférica mediante inmunofenotipado, ausencia de linfadenopatías, ausencia de hepatomegalia o esplenomegalia, ausencia de síntomas constitucionales y recuentos sanguíneos satisfactorios; remisión completa con recuperación incompleta de la médula (RCi), que en algunos casos se describe como RC más arriba, pero sin recuentos sanguíneos normales; remisión parcial (RP; también conocida en algunos casos como respuesta parcial), que en algunos casos se describe como una disminución  $\geq 50$  % del recuento de linfocitos, reducción  $\geq 50$  % de las linfadenopatías o reducción  $\geq 50$  % en hígado o bazo, junto con una mejora en los recuentos de sangre periférica; enfermedad progresiva (EP), que en algunos casos se describe como  $\geq 50$  % de aumento del recuento de linfocitos hasta  $> 5 \times 10^9/l$ ,  $\geq 50$  % de aumento de las linfadenopatías,  $\geq 50$  % de aumento del tamaño del hígado o del bazo, transformación de Richter o nuevas citopenias debidas a la LLC; y enfermedad estable, que en algunos casos se describe como que no cumple los criterios de RC, RCi, RP o EP.

En algunos casos, los sujetos presentan una RC o RO si, en el plazo de 1 mes tras la administración de la dosis de células, los ganglios linfáticos del sujeto tienen un tamaño inferior a o aproximadamente 20 mm, inferior a o aproximadamente 10 mm de tamaño o inferior a o aproximadamente 10 mm de tamaño.

En algunos casos, no se detecta un clon de referencia de la LLC en la médula ósea del sujeto (ni en la médula ósea de más del 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más de los sujetos tratados de acuerdo con los métodos. En algunos casos, un clon de referencia de la LLC se evalúa mediante secuenciación profunda de IgH. En algunos casos, el clon de referencia no se detecta en un momento que es o aproximadamente es o es al menos o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 18 o 24 meses después de la administración de las células.

En algunos casos, un sujeto presenta enfermedad morfológica si hay un porcentaje superior o igual al 5 % de blastos

en la médula ósea, por ejemplo, detectado por microscopía óptica, tal como superior o igual al 10 % de blastos en la médula ósea, superior o igual al 20 % de blastos en la médula ósea, superior o igual al 30 % de blastos en la médula ósea, superior o igual al 40 % de blastos en la médula ósea o superior o igual al 50 % de blastos en la médula ósea. En algunos casos, un sujeto presenta remisión completa o clínica si hay menos de un 5 % de blastos en la médula ósea.

En algunos casos, un sujeto tiene leucemia. El alcance de la carga de la enfermedad puede determinarse mediante la evaluación de la leucemia residual en sangre o médula ósea.

En algunos casos, un sujeto presenta enfermedad morfológica si hay un porcentaje superior o igual al 5 % de blastos en la médula ósea, por ejemplo, detectado por microscopía óptica, tal como superior o igual al 10 % de blastos en la médula ósea, superior o igual al 20 % de blastos en la médula ósea, superior o igual al 30 % de blastos en la médula ósea, superior o igual al 40 % de blastos en la médula ósea o superior o igual al 50 % de blastos en la médula ósea. En algunos casos, un sujeto presenta remisión completa o clínica si hay menos de un 5 % de blastos en la médula ósea.

En algunos casos, un sujeto puede mostrar una remisión completa, pero existe una pequeña proporción de células leucémicas residuales morfológicamente indetectables (mediante técnicas de microscopía óptica). Se dice que un sujeto presenta enfermedad residual mínima (ERM) si el sujeto presenta menos del 5 % de blastos en la médula ósea y presenta cáncer detectable molecularmente. En algunos casos, el cáncer detectable molecularmente puede evaluarse utilizando cualquiera de las diversas técnicas moleculares que permiten la detección sensible de un pequeño número de células. En algunos casos, entre estas técnicas se incluyen los ensayos de PCR, que pueden determinar reordenamientos únicos de genes de receptores de Ig/linfocitos T o transcritos de fusión producidos por translocaciones cromosómicas. En algunos casos, la citometría de flujo puede utilizarse para identificar células cancerosas basándose en inmunofenotipos específicos de la leucemia. En algunos casos, la detección molecular del cáncer puede detectar tan sólo 1 célula leucémica en 100.000 células normales. En algunos casos, un sujeto presenta ERM detectable molecularmente si se detecta al menos o más de 1 célula leucémica en 100.000 células, tal como por PCR o citometría de flujo. En algunos casos, la carga de enfermedad de un sujeto es molecularmente indetectable o ERM; de manera que, en algunos casos, no se pueden detectar células leucémicas en el sujeto mediante técnicas de PCR o citometría de flujo.

En algunos casos, un clon de referencia de leucemia, por ejemplo, LLC, no se detecta en la médula ósea del sujeto (o en la médula ósea de más del 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más de los sujetos tratados de acuerdo con los métodos. En algunos casos, un clon de referencia de leucemia, por ejemplo, LLC, se evalúa mediante secuenciación profunda de IgH. En algunos casos, el clon de referencia no se detecta en un momento que es o aproximadamente es o es al menos o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 18 o 24 meses después de la administración de las células.

En algunos casos, la ERM se detecta mediante citometría de flujo. La citometría de flujo puede utilizarse para monitorizar muestras de médula ósea y sangre periférica en busca de células cancerosas. En casos particulares, la citometría de flujo se utiliza para detectar o monitorizar la presencia de células cancerosas en la médula ósea. En algunos casos, la detección inmunológica multiparamétrica mediante citometría de flujo se utiliza para detectar células cancerosas (véase, por ejemplo, Coustan-Smith *et al.*, (1998) Lancet 351:550-554). En algunos casos, la detección inmunológica multiparamétrica por citometría de masas se utiliza para detectar células cancerosas. En algunos ejemplos, pueden utilizarse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 parámetros para detectar células cancerosas. Los antígenos utilizados para la detección se seleccionan en función del cáncer detectado (Foon y Todd (1986) Blood 68:1-31).

En algunos casos, la administración de una dosis o composición de células producidas por los métodos divulgados en el presente documento reduce la carga de la enfermedad o afección, p. ej., número de células tumorales, tamaño del tumor, duración de la supervivencia del paciente o la supervivencia libre de acontecimientos, en mayor grado y/o durante un mayor período de tiempo en comparación con la reducción que se observaría con un método comparable utilizando células generadas por un proceso alternativo. En algunos casos, la carga de una enfermedad o afección en el sujeto se detecta, evalúa o mide. La carga de enfermedad puede detectarse en algunos casos detectando el número total de células afectadas o asociadas a la enfermedad, p. ej., células tumorales, en el sujeto o en un órgano, tejido o líquido corporal del sujeto, tal como sangre o suero. En algunos casos, se evalúa la supervivencia del sujeto, la supervivencia dentro de un determinado periodo de tiempo, el grado de supervivencia, la presencia o duración de supervivencia libre de acontecimiento o síntomas, o la supervivencia libre de recaída. En algunos casos, se evalúa cualquier síntoma de la enfermedad o afección. En algunos casos, se especifica la medida de la carga de enfermedad o afección.

En algunos casos, la tasa de supervivencia libre de acontecimientos o la tasa de supervivencia global del sujeto se mejora mediante la administración de células producidas a partir de los métodos divulgados, p. ej., los métodos descritos en la Sección-I, en comparación con las células generadas por métodos alternativos. Por ejemplo, en algunos casos, la tasa o probabilidad de supervivencia libre de acontecimientos para los sujetos tratados con los métodos a los 6 meses de la dosis es superior a aproximadamente el 40 %, superior a aproximadamente el 50 %, superior a aproximadamente el 60 %, superior a aproximadamente el 70 %, superior a aproximadamente el 80 %, superior a

aproximadamente el 90 % o superior a aproximadamente el 95 %. En algunos casos, la tasa de supervivencia global es superior a aproximadamente el 40 %, superior a aproximadamente el 50 %, superior a aproximadamente el 60 %, superior a aproximadamente el 70 %, superior a aproximadamente el 80 %, superior a aproximadamente el 90 % o superior a aproximadamente el 95 %. En algunos casos, el sujeto tratado con las células producidas por los métodos divulgados presenta una supervivencia libre de acontecimientos, supervivencia sin recaída, o supervivencia hasta al menos 6 meses, o al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 años. En algunos casos, se mejora el tiempo de progresión, tal como un tiempo hasta la progresión superior a 6 meses, o al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 años.

En algunos casos, tras el tratamiento con el método, la probabilidad de recaída se reduce en comparación con otros métodos, por ejemplo, los métodos en los que el sujeto recibe una terapia celular que contiene células producidas por métodos alternativos. Por ejemplo, en algunos casos, la probabilidad de recaída a los 6 meses de la primera dosis es inferior a aproximadamente el 80 %, menos de aproximadamente el 70 %, menos de aproximadamente el 60 %, menos de aproximadamente el 50 %, menos de aproximadamente el 40 %, menos de aproximadamente el 30 %, menos de aproximadamente el 20 % o menos de aproximadamente el 10 %.

## B. Toxicidad

En determinados casos, las células, p. ej., las células de salida, producidas por los métodos divulgados en el presente documento, p. ej., tal como se describe en la Sección-I, se administran a un sujeto, y éste es controlado para detectar signos o síntomas de toxicidad.

En determinados casos, la dosis o la composición de las células, p. ej., las células de salida producidas por los métodos divulgados dan lugar a una menor tasa y/o un menor grado de toxicidad, resultado o síntoma tóxico, perfil promotor de toxicidad, factor o propiedad, tal como un síntoma o resultado asociado con o indicativo de síndrome de liberación de citocinas (SLC) o neurotoxicidad, por ejemplo, en comparación con la administración de una terapia celular alternativa, tal como una composición de linfocitos T CAR+ producida mediante un proceso alternativo.

En algunos casos, la administración de células producidas por los métodos divulgados no tiene como resultado una tasa o probabilidad elevada de toxicidad o resultados tóxicos, o reduce la tasa o probabilidad de toxicidad o resultados tóxicos, tal como la neurotoxicidad (NT), síndrome de liberación de citocinas (SLC), tal como en comparación con otras terapias celulares y/o células producidas por métodos alternativos. En algunos casos, la administración de las células, p. ej., las células de salida, producidas por los métodos divulgados tienen como resultado, o no aumentan el riesgo de, NT grave (NTg), SLC grave (SLCg), síndrome de activación de macrófagos, síndrome de lisis tumoral, fiebre de al menos o aproximadamente 38 grados Celsius durante tres o más días y un nivel plasmático de PCR de al menos o aproximadamente 20 mg/dl. En algunos casos, más de o más de aproximadamente el 30 %, 35 %, 40 %, 50 %, 55 %, 60 % o más de los sujetos tratados de acuerdo con los métodos divulgados no presentan ningún grado de SLC ni ningún grado de neurotoxicidad. En algunos casos, no más de un 50 % de los sujetos tratados (p. ej., al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o más de los sujetos tratados) presentan un síndrome de liberación de citocinas (SLC) superior al grado 2 y/o una neurotoxicidad superior al grado 2. En algunos casos, al menos el 50 % de los sujetos tratados de acuerdo con el método (p. ej., al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o más de los sujetos tratados) no presentan un resultado tóxico grave (p. ej., SLC grave o neurotoxicidad grave), tal como que no presenten neurotoxicidad de grado 3 o superior y/o que no presenten SLC grave, o que no lo presenten en un determinado período de tiempo tras el tratamiento, tal como en el plazo de una semana, dos semanas o un mes desde la administración de las células. En algunos casos, los parámetros evaluados para determinar ciertas toxicidades incluyen los acontecimientos adversos (AA), las toxicidades limitantes de la dosis (TLD), el SLC y la NT.

La administración de terapia celular T adoptiva, tal como el tratamiento con linfocitos T que expresan receptores de antígenos quiméricos, puede inducir efectos o resultados tóxicos tales como el síndrome de liberación de citocinas y la neurotoxicidad. En algunos ejemplos, tales efectos o resultados son paralelos a niveles elevados de citocinas circulantes, que pueden subyacer a la toxicidad observada.

En algunos casos, el resultado tóxico está asociado o es indicativo del síndrome de liberación de citocinas (SLC) o del SLC grave (SLCg). El SLC, p. ej., SLCg, puede producirse en algunos casos tras la terapia de linfocitos T adoptiva y la administración a sujetos de otros productos biológicos. Véase Davila *et al.*, Sci Transl Med 6, 224ra25 (2014); Brentjens *et al.*, Sci. Transl. Med. 5, 177ra38 (2013); Grupp *et al.*, N. Engl. J. Med. 368, 1509-1518 (2013); y Kochenderfer *et al.*, Blood 119, 2709-2720 (2012); Xu *et al.*, Cancer Letters 343 (2014) 172-78.

Normalmente, el SLC está causado por una respuesta inmunitaria sistémica exagerada mediada por, por ejemplo, linfocitos T, linfocitos B, linfocitos NK, monocitos y/o macrófagos. Estas células pueden liberar una gran cantidad de mediadores inflamatorios, tales como citocinas y quimiocinas. Las citocinas pueden desencadenar una respuesta inflamatoria aguda y/o inducir daños en los órganos endoteliales, lo que puede provocar fugas microvasculares, insuficiencia cardíaca o muerte. El SLC grave potencialmente mortal puede provocar infiltración pulmonar y lesiones pulmonares, insuficiencia renal o coagulación intravascular diseminada. Otras toxicidades graves potencialmente mortales pueden incluir toxicidad cardíaca, dificultad respiratoria, toxicidad neurológica y/o insuficiencia hepática.

El SLC puede tratarse con una terapia antiinflamatoria, tal como una terapia anti-IL-6, p. ej., anticuerpo anti-IL-6, p. ej., tocilizumab, o antibióticos u otros agentes como se describe. Los resultados, signos y síntomas del SLC son conocidos e incluyen los descritos en el presente documento. En algunos casos, en los que una pauta posológica o una administración concretas afectan o no afectan a un determinado resultado, signo o síntoma asociado al SLC, se pueden especificar resultados, signos y síntomas y/o cantidades o grados concretos de los mismos.

En el contexto de la administración de células que expresan CAR, el SLC suele producirse entre 6 y 20 días después de la infusión de células que expresan un CAR. Véase Xu et al., Cancer Letters 343 (2014) 172-78. En algunos casos, el SLC se produce menos de 6 días o más de 20 días después de la infusión de linfocitos T CAR. La incidencia y el momento de aparición del SLC pueden estar relacionados con los niveles basales de citocinas o la carga tumoral en el momento de la infusión. Habitualmente, el SLC implica niveles séricos elevados de interferón (IFN)- $\gamma$ , factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$ , y/o interleucina (IL)-2. Otras citocinas que pueden inducirse rápidamente en el SLC son la IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e IL-10.

Los resultados ilustrativos asociados al SLC incluyen fiebre, rigores, escalofríos, hipotensión, disnea, síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), encefalopatía, elevación de ALT/AST, insuficiencia renal, trastornos cardíacos, hipoxia, alteraciones neurológicas y muerte. Las complicaciones neurológicas incluyen el delirio, actividad convulsiva, confusión, dificultad para encontrar palabras, afasia y/u obnubilación. Otros resultados relacionados con el SLC incluyen la fatiga, náuseas, cefalea, convulsiones, taquicardia, mialgias, erupción cutánea, síndrome de fuga vascular aguda, deterioro de la función hepática e insuficiencia renal. En algunos casos, el SLC se asocia a un aumento de uno o más factores, tales como la ferritina sérica, dímero D, aminotransferasa, lactato deshidrogenasa y triglicéridos, o con hipofibrinogenemia o hepatoesplenomegalia.

Se han desarrollado criterios de SLC que parecen correlacionarse con la aparición de SLC para predecir qué pacientes tienen más probabilidades de correr el riesgo de desarrollar SLCg (véase Davilla *et al.* Science translational medicine. 2014; 6 (224): 224ra25). Los factores incluyen fiebre, hipoxia, hipotensión, cambios neurológicos, niveles séricos elevados de citocinas inflamatorias, tal como un conjunto de siete citocinas (IFN $\gamma$ , IL-5, IL-6, IL-10, Flt-3L, fractalquina y GM-CSF) cuya elevación inducida por el tratamiento puede correlacionarse bien tanto con la carga tumoral previa al tratamiento como con los síntomas del SLCg. Se conocen otras directrices sobre el diagnóstico y el tratamiento del SLC (véase, por ejemplo, Lee et al, Blood. 2014;124(2):188-95). En algunos casos, los criterios que reflejan el grado de SLC son los que se detallan en la **Tabla 2** a continuación.

Tabla 2: Criterios de calificación ilustrativos para el SLC	
Grado	Descripción de los síntomas
1 Leve	No es potencialmente mortal, solo requieren tratamiento sintomático, tal como antipiréticos y antieméticos (p. ej., fiebre, náuseas, fatiga, dolor de cabeza, mialgias, malestar general)
2 Moderado	Requieren y responden a una intervención moderada:
	• Necesidad de oxígeno < 40 %, o
	• Hipotensión que responde a líquidos o a una dosis baja de un único vasopresor, o
3 Grave	• Toxicidad orgánica de grado 2 (según CTCAE v4.0)
	Requieren y responden a una intervención agresiva:
	• Necesidad de oxígeno $\geq$ 40 %, o
	• Hipotensión que requiere dosis altas de un único vasopresor (p. ej., norepinefrina $\geq$ 20 $\mu$ g/kg/min, dopamina $\geq$ 10 $\mu$ g/kg/min, fenilefrina $\geq$ 200 $\mu$ g/kg/min, o epinefrina $\geq$ 10 $\mu$ g/kg/min), o bien
4 Potencialmente mortal	• Hipotensión que requiere múltiples vasopresores (p. ej., vasopresina + uno de los agentes anteriores, o vasopresores combinados equivalentes a $\geq$ 20 $\mu$ g/kg/min de norepinefrina), o
	• Toxicidad orgánica de grado 3 o transaminitis de grado 4 (según CTCAE v4.0)
	Potencialmente mortal:
5 Mortal	• Necesidad de asistencia respiratoria, o
	• Toxicidad orgánica de grado 4 (excluida la transaminitis)
5 Mortal	Muerte

En algunos casos, se considera que un sujeto desarrolla un "SLC grave" ("SLCg") en respuesta o secundariamente a la administración de una terapia celular o de una dosis de células de la misma, si, después de la administración, el sujeto muestra: (1) fiebre de al menos 38 grados Celsius durante al menos tres días; (2) elevación de citocinas que incluya (a) un factor de cambio máximo de al menos 75 para al menos dos del siguiente grupo de siete citocinas en

comparación con el nivel inmediatamente posterior a la administración: interferón gamma (IFN $\gamma$ ), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, fractalquina e IL-5 y/o (b) un factor de cambio máximo de al menos 250 para al menos una del siguiente grupo de siete citocinas en comparación con el nivel inmediatamente posterior a la administración: interferón gamma (IFN $\gamma$ ), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, fractalquina e IL-5; y (c) al menos un signo clínico de toxicidad tal como hipotensión (que requiera al menos un vasopresor intravenoso) o hipoxia (PO $_2$  < 90 %) o uno o más trastorno(s) neurológico(s) (incluidos cambios del estado mental, embotamiento y/o convulsiones). En algunos casos, el SLC grave incluye el SLC con un grado igual o superior a 3, tal como se expone en la Tabla 2.

En algunos casos, los resultados asociados al SLC grave o de grado 3 o superior, tal como grado 4 o superior, incluyen uno o más de: fiebre persistente, p. ej., fiebre de una temperatura determinada, p. ej., superior o aproximadamente 38 grados Celsius, durante dos o más, p. ej., tres o más, p. ej., cuatro o más días o durante al menos tres días consecutivos; fiebre superior a o aproximadamente 38 grados Celsius; elevación de las citocinas, tal como un factor de cambio máximo, p. ej., de al menos o aproximadamente 75, en comparación con los niveles previos al tratamiento de al menos dos citocinas (p. ej., al menos dos del grupo formado por interferón gamma (IFN $\gamma$ ), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, fractalquina e IL-5, y/o factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ )), o un factor de cambio máximo, p. ej., de al menos o aproximadamente 250 de al menos una de dichas citocinas; y/o al menos un signo clínico de toxicidad, tal como hipotensión (p. ej., medida por al menos un vasopresor intravenoso); hipoxia (p. ej., niveles de oxígeno plasmático (PO $_2$ ) inferiores a o aproximadamente un 90 %); y/o uno o más trastornos neurológicos (incluidas alteraciones del estado mental, embotamiento y convulsiones). En algunos casos, el SLC grave incluye el SLC que requiere tratamiento o cuidados en la unidad de cuidados intensivos (UCI).

En algunos casos, el SLC, tal como el SLC grave, abarca una combinación de (1) fiebre persistente (fiebre de al menos 38 grados Celsius durante al menos tres días) y (2) un nivel sérico de PCR de al menos o aproximadamente 20 mg/dl. En algunos casos, el SLC engloba la hipotensión que requiere el uso de dos o más vasopresores o la insuficiencia respiratoria que requiere ventilación mecánica. En algunos casos, se aumenta la dosis de vasopresores en una segunda o posterior administración.

En algunos casos, el SLC grave o de grado 3 engloba un aumento de la alanina aminotransferasa, un aumento de la aspartato aminotransferasa, escalofríos, neutropenia febril, cefalea, disfunción ventricular izquierda, encefalopatía, hidrocefalia y/o temblor.

Puede especificarse el método de medición o detección de los distintos resultados.

En algunos casos, el resultado tóxico es o está asociado a neurotoxicidad. En algunos casos, los síntomas asociados con un riesgo clínico de neurotoxicidad incluyen confusión, delirios, afasia expresiva, embotamiento, mioclonía, letargia, estado mental alterado, convulsiones, actividad convulsiva, ataques (opcionalmente confirmados por electroencefalograma [EEG]), niveles elevados de beta amiloide (A $\beta$ ), niveles elevados de glutamato, y niveles elevados de radicales de oxígeno. En algunos casos, la neurotoxicidad se clasifica en función de la gravedad (p. ej., utilizando una escala de Grado 1-5 (véase, p. ej., Guido Cavaletti & Paola Marmiroli Nature Reviews Neurology 6, 657-666 (diciembre de 2010); Instituto Nacional del Cáncer-Criterios Comunes de Toxicidad versión 4.03 (NCI-CTCAE v4.03).

En algunos casos, los síntomas neurológicos pueden ser los primeros síntomas del SLCg. En algunos casos, se observa que los síntomas neurológicos comienzan entre 5 y 7 días después de la infusión de la terapia celular. En algunos casos, la duración de los cambios neurológicos puede variar de 3 a 19 días. En algunos casos, la recuperación de los cambios neurológicos se produce después de que se hayan resuelto otros síntomas del SLCg. En algunos casos, el tiempo o grado de resolución de los cambios neurológicos no se acelera con el tratamiento con anti-IL-6 y/o esteroide(s).

En algunos casos, se considera que un sujeto desarrolla "neurotoxicidad grave" en respuesta a la administración de una terapia celular o de una dosis de células de la misma, o como efecto secundario de la misma, si, después de la administración, el sujeto presenta síntomas que limitan su autocuidado (p. ej., bañarse, vestirse y desvestirse, alimentarse, ir al baño, tomar medicamentos) de entre: 1) síntomas de neuropatía motora periférica, incluida la inflamación o degeneración de los nervios motores periféricos; 2) síntomas de neuropatía sensorial periférica, incluida la inflamación o degeneración de los nervios sensoriales periféricos, disestesia, tal como la distorsión de la percepción sensorial, provocando una sensación anormal y desagradable, neuralgia, tal como sensación dolorosa intensa a lo largo de un nervio o un grupo de nervios, y/o parestesia, tales como alteraciones funcionales de las neuronas sensoriales que dan lugar a sensaciones cutáneas anormales de hormigueo, entumecimiento, presión, frío y calor en ausencia de estímulo. En algunos casos, la neurotoxicidad grave incluye la neurotoxicidad de grado 3 o superior, tal como se establece en la **Tabla 3**.

**Tabla 3: Criterios de clasificación ilustrativos para la neurotoxicidad**

Grado	Descripción de los síntomas
1 Asintomático o leve	Síntomas leves o asintomáticos
2 Moderado	Presencia de síntomas que limitan las actividades instrumentales de la vida diaria (AVD), tales como preparar comidas, compra de alimentos o ropa, uso del teléfono, manejo de dinero
3 Grave	Presencia de síntomas que limitan las AVD de autocuidado, tales como bañarse, vestirse y desvestirse, alimentarse a sí mismo, uso del baño, toma de medicamentos
4 Potencialmente mortal	Síntomas que son potencialmente mortales, que requieren una intervención urgente
5 Mortal	Muerte

En algunos casos, los métodos reducen los síntomas asociados al SLC o la neurotoxicidad en comparación con otros métodos. En algunos casos, los métodos divulgados reducen los síntomas, resultados o factores asociados al SLC, incluidos los síntomas, resultados o factores asociados al SLC grave o de grado 3 o superior, en comparación con otros métodos. Por ejemplo, los sujetos tratados de acuerdo con los presentes métodos pueden carecer de síntomas detectables y/o presentar menores síntomas, resultados o factores del SLC, p. ej., SLC grave o SLC de grado 3 o superior, tal como cualquiera de los descritos, p. ej., como se establece en la **Tabla 2**. En algunos casos, los sujetos tratados de acuerdo con los presentes métodos pueden presentar síntomas reducidos de neurotoxicidad, tales como debilidad o entumecimiento de las extremidades, pérdida de memoria, visión y/o intelecto, comportamientos obsesivos y/o compulsivos incontrolables, delirio, cefalea, problemas cognitivos y de comportamiento, incluida la pérdida de control motor, deterioro cognitivo, disfunción del sistema nervioso autónomo y disfunción sexual, en comparación con los sujetos tratados con otros métodos. En algunos casos, los sujetos tratados de acuerdo con los presentes métodos pueden presentar una reducción de los síntomas asociados a la neuropatía motora periférica, neuropatía sensorial periférica, disestesia, neuralgia o parestesia.

En algunos casos, la administración de células producidas por los métodos divulgados reduce los resultados asociados con la neurotoxicidad, incluidos los daños al sistema nervioso y/o al cerebro, tal como la muerte de neuronas. En algunos casos, los métodos reducen el nivel de factores asociados a la neurotoxicidad, tal como el beta amiloide (A $\beta$ ), glutamato y radicales de oxígeno.

En algunos casos, se administra una o más intervenciones o agentes para tratar la toxicidad, tales como las terapias dirigidas a la toxicidad, en un momento en donde o inmediatamente después de que se determine o confirme que el sujeto (como cuando se determina o confirma por primera vez) presenta fiebre continuada, por ejemplo, medida según cualquiera de los casos mencionados. En algunos casos, la una o más terapias dirigidas a la toxicidad se administra dentro de un cierto periodo de tiempo tras dicha confirmación o determinación, tales como en un plazo de 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 6 horas, u 8 horas de las mismas.

#### IV. ARTÍCULOS MANUFACTURADOS

También se divulgan artículos manufacturados y kits que contienen células modificadas genéticamente que expresan un receptor recombinante producido por los métodos divulgados en el presente documento, tales como los métodos descritos en la Sección I y/o las composiciones de salida de células descritas en la Sección IF, y opcionalmente instrucciones de uso, por ejemplo, instrucciones para administrar las células modificadas a un sujeto, tal como mediante los métodos descritos en la Sección III.

En algunos casos, en el presente documento se divulgan artículos manufacturados y/o kits que incluyen una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las células modificadas genéticamente descritas en el presente documento, e instrucciones para su administración, a un sujeto para tratar una enfermedad o afección. En algunos casos, las instrucciones pueden especificar algunos o todos los elementos de los métodos para administrar las células que se divulgan en el presente documento. En algunos casos, las instrucciones especifican instrucciones particulares para la administración de las células para terapia celular, p. ej., dosis, momento, selección y/o identificación de los sujetos para la administración y condiciones de administración. En algunos casos, los artículos manufacturados y/o kits comprenden además un agente para la terapia de linfosupresión, y opcionalmente incluyen además instrucciones para administrar la terapia de linfosupresión. En algunos casos, las instrucciones pueden incluirse como etiqueta o prospecto que acompañe a las composiciones para administración.

En algunos casos, el artículo manufacturado puede tener un recipiente, opcionalmente un vial, que contiene una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos que expresan un receptor recombinante. En algunos casos, el artículo manufacturado o kit comprende opcionalmente un segundo recipiente, opcionalmente un segundo vial, que contiene una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos que expresan un receptor recombinante. En algunos casos, se incluye un crioprotector con las células. En algunos casos, el recipiente es un vial o una bolsa. En algunos casos, el



recipiente contiene una composición de linfocitos T CD4+ y CD8+ enriquecidos.

En algunos casos, la composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos dentro del recipiente incluye al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 %, al menos un 99,9 %, o un o aproximadamente un 100 % de linfocitos T CD4+. En determinados casos, la composición del recipiente incluye al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 %, al menos un 99,9 %, o un o aproximadamente un 100 % de linfocitos T CD4+ que expresan el receptor recombinante y/o han sido transducidos o transfectados con el polinucleótido recombinante. En determinados casos, la composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos dentro del recipiente incluye menos del 40 %, menos del 35 %, menos del 30 %, menos del 25 %, menos del 20 %, menos del 15 %, menos del 10 %, menos del 5 %, menos del 1 %, menos del 0,1 %, o menos del 0,01 % de linfocitos T CD8+, y/o no contiene linfocitos T CD8+, y/o está exenta o sustancialmente exenta de linfocitos T CD8+.

En algunos casos, la composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos dentro del recipiente incluye al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 %, al menos un 99,9 %, o un o aproximadamente un 100 % de linfocitos T CD8+. En casos particulares, la composición con el recipiente tiene al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 %, al menos un 99,9 %, o un o aproximadamente un 100 % de linfocitos T CD8+ que expresan el receptor recombinante y/o han sido transducidos o transfectados con el polinucleótido recombinante. En determinados casos, la composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos de salida que se administra al sujeto incluye menos del 40 %, menos del 35 %, menos del 30 %, menos del 25 %, menos del 20 %, menos del 15 %, menos del 10 %, menos del 5 %, menos del 1 %, menos del 0,1 %, o menos del 0,01 % de linfocitos T CD4+, y/o no contiene linfocitos T CD4+, y/o está exenta o sustancialmente exenta de linfocitos T CD4+.

En algunos casos, las instrucciones especifican la dosis de células que debe administrarse. Por ejemplo, en algunos casos, la dosis especificada en las instrucciones incluye un total de células que expresan el receptor recombinante (p. ej., CAR) entre aproximadamente  $1 \times 10^6$  y  $3 \times 10^8$ , p. ej., en el intervalo de aproximadamente  $1 \times 10^7$  a  $2 \times 10^8$  células de este tipo, tales como un total de  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  o  $1,5 \times 10^8$  de dichas células, o el intervalo entre dos de los valores anteriores. En algunos casos, al paciente se le administran múltiples dosis, y cada una de las dosis o la dosis total puede estar dentro de cualquiera de los valores anteriores.

En algunos casos, el recipiente, tal como el vial, comprende más o más de aproximadamente  $10 \times 10^6$  linfocitos T o linfocitos T recombinantes que expresan el receptor, más o más de aproximadamente  $15 \times 10^6$  linfocitos T o linfocitos T recombinantes que expresan el receptor, más o más de aproximadamente  $25 \times 10^6$  linfocitos T o linfocitos T recombinantes que expresan el receptor. En algunos casos, el vial comprende entre aproximadamente 10 millones de células por ml y aproximadamente 70 millones de células por ml, entre aproximadamente 10 millones de células por ml y aproximadamente 50 millones de células por ml, entre aproximadamente 10 millones de células por ml y aproximadamente 25 millones de células por ml, entre aproximadamente 10 millones de células por ml y aproximadamente 15 millones de células por ml, 15 millones de células por ml y aproximadamente 70 millones de células por ml, entre aproximadamente 15 millones de células por ml y aproximadamente 50 millones de células por ml, entre aproximadamente 15 millones de células por ml y aproximadamente 25 millones de células por ml, entre aproximadamente 25 millones de células por ml y aproximadamente 70 millones de células por ml, entre aproximadamente 25 millones de células por ml y aproximadamente 50 millones de células por ml, y entre aproximadamente 50 millones de células por ml y aproximadamente 70 millones de células por ml.

En algunos casos, la pluralidad de viales o pluralidad de células o dosis unitaria de células especificada para la administración, colectivamente, comprende una dosis de células que comprende de  $1 \times 10^5$  a  $5 \times 10^8$  o de aproximadamente  $1 \times 10^5$  a aproximadamente  $5 \times 10^8$  de linfocitos T totales que expresan el receptores recombinante o linfocitos T totales, de  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^8$  o de aproximadamente  $1 \times 10^5$  a aproximadamente  $1 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan el receptor recombinante o linfocitos T totales, de  $5 \times 10^5$  a  $1 \times 10^7$  o de aproximadamente  $5 \times 10^5$  a aproximadamente  $1 \times 10^7$  linfocitos T totales que expresan el receptor recombinante o linfocitos T totales, o de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  o de aproximadamente  $1 \times 10^6$  a aproximadamente  $1 \times 10^7$  linfocitos T totales que expresan el receptor recombinante o linfocitos T totales, cada uno inclusive. En algunos casos, el artículo comprende una o más dosis unitarias de los linfocitos T CD4+ y CD8+ o de los linfocitos T CD4+receptor+ y CD8+receptor+, en donde la dosis unitaria comprende entre o aproximadamente  $1 \times 10^7$  y o aproximadamente  $2 \times 10^8$  linfocitos T recombinantes que expresan el receptor, entre o aproximadamente  $5 \times 10^7$  y o aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  linfocitos T recombinantes que expresan el receptor,  $5 \times 10^7$  o aproximadamente linfocitos T recombinantes que expresan el receptor,  $1 \times 10^8$  o aproximadamente linfocitos T recombinantes que expresan el receptor, o  $1,5 \times 10^8$  o aproximadamente linfocitos T recombinantes que expresan el receptor, opcionalmente, en donde la información del artículo especifica la administración de una o de una pluralidad de dosis unitarias y/o un volumen correspondiente a dicha una o pluralidad de dosis unitarias. En algunos casos, el artículo comprende una o más dosis unitarias de los linfocitos T CD8+, en donde la dosis comprende entre o aproximadamente  $5 \times 10^6$  y o aproximadamente  $1 \times 10^8$  linfocitos T CD8+ que

expresan el receptor recombinante, la dosis comprende entre o aproximadamente  $1 \times 10^7$  y o aproximadamente  $0,75 \times 10^8$  linfocitos T CD8+ que expresan el receptor recombinante, la dosis comprende  $2,5 \times 10^7$  o aproximadamente linfocitos T CD8+ que expresan el receptor recombinante, o la dosis comprende  $5 \times 10^7$  o aproximadamente linfocitos T CD8+ que expresan el receptor recombinante, o la dosis comprende  $0,75 \times 10^8$  o aproximadamente linfocitos T CD8+ que expresan el receptor recombinante, opcionalmente, en donde la información del artículo especifica la administración de una o de una pluralidad de dosis unitarias y/o un volumen correspondiente a dicha una o pluralidad de dosis unitarias. En algunos casos, las células del artículo, colectivamente, comprenden una dosis de células que comprende no más de  $1 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan el receptor recombinante o linfocitos T totales, no más de  $1 \times 10^7$  linfocitos T totales que expresan el receptor recombinante o linfocitos T totales, no más de  $0,5 \times 10^7$  linfocitos T totales que expresan el receptor recombinante o linfocitos T totales, no más de  $1 \times 10^6$  linfocitos T totales que expresan el receptor recombinante o linfocitos T totales, no más de  $0,5 \times 10^6$  linfocitos T totales que expresan el receptor recombinante o linfocitos T totales.

En algunos casos, las instrucciones pueden especificar la pauta posológica y el momento de la administración. Por ejemplo, en algunos casos, las instrucciones pueden especificar la administración al sujeto de múltiples dosis, p. ej., dos o más dosis, de las células. En algunos casos, las instrucciones especifican el calendario de las dosis múltiples, p. ej., la segunda dosis se administra aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 días después de la primera dosis; y/o la cantidad administrada en cada dosis.

En algunos casos, el artículo manufacturado o kit comprende una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos que expresan un receptor recombinante, e instrucciones para la administración, a un sujeto que tiene una enfermedad o afección, de la totalidad o una parte de la composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos y la administración adicional de linfocitos T CD8+ que expresan un receptor recombinante. En algunos casos, las instrucciones especifican la administración de los linfocitos T CD4+ antes de la administración de los linfocitos T CD8+. En algunos casos, las instrucciones especifican la administración de los linfocitos T CD8+ antes de la administración de los linfocitos T CD4+. En algunos casos, el artículo manufacturado o kit comprende una pluralidad de linfocitos T CD8+ que expresan un receptor recombinante, e instrucciones para la administración, a un sujeto que tiene una enfermedad o afección, de la totalidad o una parte de la pluralidad de linfocitos T CD8+ y linfocitos T CD4+ que expresan un receptor recombinante. En algunos casos, las instrucciones especifican el régimen de dosificación y el momento de la administración de las células.

En algunos casos, las instrucciones especifican la administración de la totalidad o una parte de los linfocitos T CD4+ y de la totalidad o una parte de los linfocitos T CD8+ con un intervalo de 0 a 12 horas, con un intervalo de 0 a 6 horas o de 0 a 2 horas. En algunos casos, las instrucciones especifican la administración de los linfocitos T CD4+ y los linfocitos T CD8+ en un intervalo de no más de 2 horas, no más de 1 hora, no más de 30 minutos, no más de 15 minutos, no más de 10 minutos o no más de 5 minutos.

En algunos casos, las instrucciones especifican la dosis o el número de células o tipo(s) celular(es) y/o una proporción de tipos celulares, p. ej., poblaciones individuales o subtipos, tales como la proporción entre CD4+ y CD8+. En algunos casos, las poblaciones o subtipos de células, tales como los linfocitos T CD8+ y CD4+. Por ejemplo, en algunos casos, las instrucciones especifican que las células se administran en o dentro de un intervalo tolerado de una proporción de salida de múltiples poblaciones o subtipos celulares, tales como linfocitos o subtipos CD4+ y CD8+, de entre o aproximadamente 5:1 y de o aproximadamente 5:1 (o superior a aproximadamente 1:5 e inferior a aproximadamente 5:1), o de entre o aproximadamente 1:3 y de o aproximadamente 3:1 (o superior a aproximadamente 1:3 e inferior a aproximadamente 3:1), tal como de entre o aproximadamente 2:1 y de o aproximadamente 1:5 (o superior a aproximadamente 1:5 e inferior a aproximadamente 2:1, tal como o aproximadamente 5:1, 4,5:1, 4:1, 3,5:1, 3:1, 2,5:1, 2:1, 1,9:1, 1,8:1, 1,7:1, 1,6:1, 1,5:1, 1,4:1, 1,3:1, 1,2:1, 1,1:1, 1:1, 1:1,1, 1:1,2, 1:1,3, 1:1,4, 1:1,5, 1:1,6, 1:1,7, 1:1,8, 1:1,9: 1:2, 1:2,5, 1:3, 1:3,5, 1:4, 1:4,5 o 1:5. En determinados casos, las instrucciones especifican que las composiciones de linfocitos T CD4+ enriquecidos y linfocitos T CD8+ enriquecidos se combinan en la proporción deseada y se administran al sujeto como una única composición de células. En casos particulares, las instrucciones especifican que las composiciones de linfocitos T CD4+ enriquecidos y linfocitos T CD8+ enriquecidos se administran como composiciones separadas en la proporción deseada. En algunos casos, la diferencia tolerada está dentro de aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 35 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 45 %, aproximadamente el 50 % de la proporción deseada, incluyendo cualquier valor entre estos intervalos.

## V. DEFINICIONES

Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente para referirse a un polímero de restos de aminoácidos, y no se limitan a una longitud mínima. Los polipéptidos, incluidos los receptores divulgados y otros polipéptidos, p. ej., enlazadores o péptidos, pueden incluir restos de aminoácidos que incluyen restos de aminoácidos naturales y/o no naturales. Los términos también incluyen modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, por ejemplo, glucosilación, sialilación, acetilación y fosforilación. En algunos casos, los polipéptidos pueden contener modificaciones con respecto a una secuencia nativa o natural, siempre que la proteína mantenga la actividad deseada.

Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como mediante mutagénesis dirigida, o pueden ser accidentales, tal como mediante mutaciones de hospedadores que producen las proteínas o errores debidos a la amplificación por la PCR.

5 Como se utiliza en el presente documento, un "sujeto" es un mamífero, tal como un ser humano u otro animal, y normalmente es un ser humano. En algunos casos, el sujeto, p. ej., paciente, al que se administra el agente o agentes, células, poblaciones celulares o composiciones, es un mamífero, normalmente un primate, tal como un ser humano. En algunos casos, el primate es un mono o un simio. El sujeto puede ser hombre o mujer y puede tener cualquier edad adecuada, incluyendo bebés, jóvenes, adolescentes, adultos y sujetos geriátricos. En algunos casos, el sujeto es un  
10 mamífero no primate, tal como un roedor.

Como se utiliza en el presente documento, "tratamiento" (y variaciones gramaticales del mismo tales como "tratar" o "que trata") se refiere a la mejora o reducción completa o parcial de una enfermedad o afección o trastorno, o un síntoma, efecto o resultado adverso, o fenotipo asociado con el mismo. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no se limitan a, prevenir la aparición o recidiva de la enfermedad, aliviar los síntomas, disminuir cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevenir la metástasis, disminuir la velocidad de progresión de la enfermedad, mejorar o paliar el cuadro clínico y remisión o pronóstico mejorado. Los términos no implican la curación completa de una enfermedad o la eliminación completa de cualquier síntoma o efecto(s) en todos los síntomas o resultados.

20 Como se utiliza en el presente documento, "retrasar el desarrollo de una enfermedad" significa diferir, impedir, ralentizar, retardar, estabilizar, suprimir y/o posponer el desarrollo de la enfermedad (como el cáncer). Este retraso puede ser de longitudes de tiempo variables, dependiendo de los antecedentes de la enfermedad y/o del individuo que se trate. En algunos casos, un retraso suficiente o significativo puede, en efecto, abarcar la prevención, en el  
25 sentido de que el individuo no desarrolla la enfermedad. Por ejemplo, un cáncer en estadio avanzado, tal como el desarrollo de metástasis, puede retrasarse.

"Que previene", como se utiliza en el presente documento, incluye proporcionar profilaxis con respecto a la aparición o recurrencia de una enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que aún no ha sido diagnosticado con la enfermedad. En algunos casos, las células y composiciones divulgadas se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para frenar la progresión de una enfermedad.

Como se utiliza en el presente documento, "suprimir" una función o actividad es reducir la función o actividad en comparación con las mismas condiciones, excepto por una condición o parámetro de interés, o alternativamente, en comparación con otra condición. Por ejemplo, las células que suprimen el crecimiento tumoral reducen la tasa de crecimiento del tumor en comparación con la tasa de crecimiento del tumor en ausencia de las células.

Una "cantidad eficaz" de un agente, p. ej., una formulación farmacéutica, células, o composición, en el contexto de la administración, se refiere a una cantidad eficaz, a las dosis/cantidades y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr un resultado deseado, tal como un resultado terapéutico o profiláctico.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente, p. ej., una formulación farmacéutica o células, se refiere a una cantidad eficaz, a las dosificaciones y durante los periodos de tiempo necesarios, para conseguir un resultado terapéutico deseado, tal como para el tratamiento de una enfermedad, afección o trastorno y/o efecto farmacocinético o farmacodinámico del tratamiento. La cantidad terapéuticamente eficaz puede variar de acuerdo con factores tales como la patología, la edad, el sexo, el peso del sujeto y las poblaciones de células administradas. En algunos casos, los métodos divulgados implican la administración de las células y/o composiciones en cantidades eficaces, p. ej., cantidades terapéuticamente eficaces.

50 Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad que es eficaz, a las dosificaciones y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Generalmente, pero no necesariamente, dado que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes de o en una etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz. En el contexto de una menor carga tumoral, en algunos casos, la cantidad profilácticamente eficaz será superior a la cantidad terapéuticamente eficaz.

55 El término "aproximadamente", como se usa en el presente documento, se refiere al intervalo de error habitual para el valor correspondiente, fácilmente conocido por los expertos en este campo técnico. La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) casos que se refieren a ese valor o parámetro en sí.

60 Como se utiliza en el presente documento, las formas en singular "un/uno", "una", "el" y "la" incluyen las referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Por ejemplo, "un" o "una" significa "al menos uno" o "uno o más".

65 A lo largo de la presente divulgación, diversos casos de la materia objeto reivindicada se presentan en un formato de intervalo. Ha de comprenderse que la descripción en formato de intervalo es meramente por conveniencia y brevedad,

y no debe interpretarse como una limitación inflexible del alcance de la materia objeto reivindicada. En consecuencia, debe considerarse que la descripción de un intervalo ha divulgado específicamente todos los subintervalos posibles, así como los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor afirmado o que interviene en el intervalo comentado queda englobado dentro de la materia objeto reivindicada. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse de manera independiente en los intervalos más pequeños, y también están englobados dentro de la materia objeto reivindicada, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen alguno o ambos de los límites incluidos también quedan englobados en la materia objeto reivindicada. Esto es aplicable independientemente de la amplitud del intervalo.

Como se utiliza en el presente documento, una composición se refiere a cualquier mezcla de dos o más productos, sustancias o compuestos, incluyendo células. Puede ser una solución, una suspensión, líquido, polvo, una pasta, acuoso, no acuoso o cualquier combinación de los mismos.

Como se utiliza en el presente documento, "enriquecimiento" cuando se refiere a uno o más tipos celulares o poblaciones celulares particulares, se refiere a aumentar el número o porcentaje del tipo o población celular, p. ej., en comparación con el número total de células o el volumen de la composición, o con relación a otros tipos celulares, tal como mediante selección positiva basada en marcadores expresados por la población o célula, o mediante selección negativa basada en un marcador no presente en la población celular o célula que ha de empobrecerse. El término no requiere la eliminación total de otras células, tipo o poblaciones celulares de la composición y no requiere que las células enriquecidas de este modo estén presentes en o incluso cerca del 100 % en la composición enriquecida.

Como se utiliza en el presente documento, una declaración de que una célula o población celular es "positiva" para un marcador particular se refiere a la presencia detectable en la célula de un marcador particular, normalmente un marcador de superficie. Al referirse a un marcador de superficie, el término se refiere a la presencia de expresión superficial detectada por citometría de flujo, por ejemplo, mediante tinción con un anticuerpo que se une específicamente al marcador y detectando dicho anticuerpo, en donde la tinción es detectable mediante citometría de flujo a un nivel sustancialmente por encima de la tinción detectada realizando el mismo procedimiento con un control de isotipo emparejado o fluorescencia menos un (FMO, por sus siglas en inglés) control de activación en condiciones por lo demás idénticas y/o a un nivel sustancialmente similar al de una célula que se sabe que es positiva para el marcador, y/o a un nivel sustancialmente superior al de una célula que se sabe que es negativa para el marcador.

Como se utiliza en el presente documento, una declaración de que una célula o población de células es "negativa" para un marcador en particular se refiere a la ausencia de presencia sustancial detectable sobre o dentro de la célula de un marcador en particular, normalmente un marcador de superficie. Al referirse a un marcador de superficie, el término se refiere a la ausencia de expresión superficial detectada por citometría de flujo, por ejemplo, mediante tinción con un anticuerpo que se une específicamente al marcador y detectando dicho anticuerpo, en donde la tinción no se detecta mediante citometría de flujo a un nivel sustancialmente por encima de la tinción detectada realizando el mismo procedimiento con un control de isotipo emparejado o fluorescencia menos un (FMO, por sus siglas en inglés) control de activación en condiciones por lo demás idénticas y/o a un nivel sustancialmente inferior al de una célula que se sabe que es positiva para el marcador, y/o a un nivel sustancialmente similar en comparación con la de una célula que se sabe que es negativa para el marcador.

El término "vector", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede propagar otro ácido nucleico al que está unido. El término incluye el vector en forma de una estructura de ácido nucleico autorreplicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula hospedadora en donde se ha introducido. Determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de ácidos nucleicos a los que están operativamente unidos. En el presente documento dichos vectores se denominan "vectores de expresión".

## VII. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen con fines ilustrativos únicamente y no tienen por objeto limitar el alcance de la invención.

### **Ejemplo 1: Procesos para generar composiciones terapéuticas de linfocitos CD4+ y CD8+ que expresan un CAR anti-CD19.**

Se produjeron linfocitos T CD4+ modificados genéticamente y linfocitos T CD8+ modificados genéticamente que expresaban cada uno el mismo receptor de antígeno quimérico (CAR) anti-CD19 mediante un proceso que implicaba someter a poblaciones de linfocitos CD4+ y CD8+ enriquecidos, por separado, a las etapas del proceso. Los linfocitos CD4+ y CD8+ se seleccionaron por separado a partir de células mononucleares de sangre periférica humana (CMSP) obtenidas por leucocitaféresis, generando composiciones de linfocitos CD4+ y CD8+ enriquecidas separadas, que después se criocongelaron. Las composiciones CD4+ y CD8+ se descongelaron posteriormente y se sometieron por separado a las etapas para la estimulación, transducción y expansión.

Los linfocitos CD4+ y CD8+ descongelados se estimularon por separado en presencia de perlas paramagnéticas recubiertas de poliestireno acopladas a anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 en una proporción de 1:1 de perla por célula. La estimulación se llevó a cabo en medios que contenían IL-2 recombinante humana, IL-15 recombinante humana y N-acetil cisteína (NAC). Los medios para linfocitos CD4+ también incluían IL-7 recombinante humana.

Tras la introducción de las perlas, los linfocitos CD4+ y CD8+ se transdujeron por separado con un vector lentivírico que codificaba el mismo CAR anti-CD19. El CAR contenía un scFv anti-CD19 derivado de un anticuerpo murino, un espaciador de inmunoglobulina, un dominio transmembrana derivado de CD28, una región coestimuladora derivada de 4-1BB, y un dominio de señalización intracelular CD3-zeta. El vector también codificaba un EGFR truncado (EGFRt) que servía como marcador indirecto de la expresión de CAR y que estaba conectado a la construcción CAR mediante una secuencia T2A. Las células se transdujeron en presencia de 10 µg/ml de sulfato de protamina.

Después de la transducción, las perlas se retiraron de las composiciones de células por exposición a un campo magnético. A continuación, las composiciones de linfocitos CD4+ y CD8+ se cultivaron por separado para su expansión con mezcla continua y transferencia de oxígeno mediante un biorreactor (biorreactor Xuri W25). Se añadió poloxámero al medio. Ambas composiciones de células se cultivaron en presencia de IL-2 e IL-15. Los medios para linfocitos CD4+ también incluían IL-7. Los linfocitos CD4+ y CD8+ se cultivaron, antes de cosechar hasta una expansión de 4 veces. Un día después de alcanzar el umbral, las células de cada composición se cosecharon, formularon y criocongelaron por separado. El proceso ilustrativo se resume en la Tabla E1.

**Tabla E1: Resumen del proceso ilustrativo para generar linfocitos T-CAR CD4+ y CD8+**

Estadio	Linfocitos CD4+	Linfocitos CD8+
<b>Estimulación</b> (día 1-2)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• perlas conjugadas con anticuerpos anti-CD3/CD28</li> <li>• proporción entre perlas y células 1:1</li> <li>• medios: IL-2, IL-7, IL-15 y NAC</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• perlas conjugadas con anticuerpos anti-CD3/CD28</li> <li>• proporción entre perlas y células 1:1</li> <li>• medios: IL-2, IL-15 y NAC</li> </ul>
<b>Transducción</b> (día 2-5)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• adyuvante de la transducción (p. ej., 10 µg/ml de sulfato de protamina)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• adyuvante de la transducción (p. ej., 10 µg/ml de sulfato de protamina)</li> </ul>
<b>Eliminación de las perlas</b> (día 5*)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• eliminación de las perlas magnéticas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• eliminación de las perlas magnéticas</li> </ul>
<b>Expansión (día 5* - Cosecha)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• biorreactor de movimiento oscilante y/o mezcla continua</li> <li>• medios: IL-2, IL-7, IL15, y poloxámero</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• biorreactor de movimiento oscilante y/o mezcla continua</li> <li>• medios: IL-2, IL15, y poloxámero</li> </ul>
*Aproximado		

El proceso ilustrativo resumido en la Tabla E1 se comparó con un proceso alternativo ilustrativo. El proceso alternativo difería en que: No se añadió NAC a los medios durante la estimulación; Los medios para linfocitos CD4+ no contenían IL-2; las células se estimularon en una proporción de 3:1 de perla por célula; las células se transdujeron con una mayor concentración de sulfato de protamina; la eliminación de las perlas se produjo hacia aproximadamente el día 7; y la expansión se realizó en un ajuste estático, es decir, sin mezcla o perfusión continua (p. ej., perfusión semicontinua y/o escalonada), y sin poloxámero.

#### **Ejemplo 2: Evaluación de la duración del proceso para generar composiciones terapéuticas de linfocitos T-CAR CD4+ y CD8+.**

Se evaluaron varios atributos de los procesos ilustrativos y alternativos descritos en el Ejemplo 1. En un experimento, se ejecutaron las etapas del proceso para los procesos ilustrativo y alternativo con composiciones de linfocitos CD4+ y CD8+ separadas obtenidas de la misma muestra de leucocitaféresis humana de LDLBG. El recuento total de células se midió en diferentes momentos durante la estimulación, transducción y expansión de cada proceso. Como se muestra en la Figura 1, las composiciones de linfocitos CD4+ y CD8+ sometidas al proceso ilustrativo se expandieron más rápidamente y alcanzaron el grado de expansión ilustrativo (expansión 4 veces mayor), que se había designado como objetivo en este estudio antes de la cosecha, en menos tiempo que con el proceso alternativo.

Se evaluaron las duraciones de la fase de expansión (en este estudio se realizó hasta la expansión de 4 veces) del proceso ilustrativo del Ejemplo 1 y del proceso alternativo a partir de varias ejecuciones del proceso de composiciones de linfocitos CD4+ y CD8+ separadas obtenidas de muestras de leucocitaféresis recogidas de sujetos con LDLBG. La duración de esta fase del proceso ilustrativo se evaluó basándose en un conjunto de ejecuciones ilustrativas con composiciones de linfocitos CD4+ y CD8+ separadas obtenidas a partir de muestras de leucocitaféresis recogidas de sujetos sanos y sujetos con LDLBG. La duración se midió como el tiempo transcurrido entre el inicio de la estimulación

y la cosecha (que en este estudio ilustrativo se produjo un día después de alcanzar una expansión cuádruple). En este estudio, se observó que las ejecuciones del proceso ilustrativo tenían una duración más corta desde el inicio de la expansión hasta la cosecha, con una distribución más estrecha (p. ej., entre 9 y 13 días en un estudio) entre las distintas ejecuciones para esta duración, en comparación con la duración del proceso alternativo.

Se modelaron las duraciones de los protocolos de fabricación ilustrativos que utilizan los procesos ilustrativos y alternativos (protocolos de fabricación ilustrativos y alternativos, respectivamente). En general, los resultados de la modelización fueron coherentes con la interpretación de que el proceso ilustrativo es capaz de lograr duraciones de protocolo comparativamente más cortas, con menos variabilidad, que otros protocolos de fabricación.

### **Ejemplo 3: Evaluación de procesos para generar composiciones terapéuticas de linfocitos T-CAR CD4+ y CD8+.**

Un conjunto ilustrativo de composiciones de linfocitos CD4+ y CD8+ obtenidas a partir de muestras (incluidas las de un proceso alternativo, que presentaban una duración de la fase de expansión (expansión hasta la cosecha (expansión de 4 veces)) superior a 17 días y las que presentaban una duración de la fase de expansión igual o inferior a 17 días se procesaron mediante el proceso ilustrativo. El recuento total de células se midió en diferentes momentos durante la estimulación, transducción y expansión hasta alcanzar el umbral de cosecha.

Las composiciones de linfocitos CD4+ y CD8+ que se han expandido 4 veces se generaron con el proceso ilustrativo, a partir de muestras de ambos tipos de composiciones (las que se observa que se expanden hasta 4 veces en menos de 17 días o más y las que se observa que lo hacen en más de 17 días, en el otro proceso), con un bajo intervalo de variabilidad en la duración.

### **Ejemplo 4: Generación de composiciones terapéuticas de linfocitos T-CAR CD4+ y CD8+ a partir de una muestra biológica obtenida de un sujeto con leucemia linfocítica crónica.**

Composiciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ separadas que se seleccionaron a partir de CMSP aisladas de una muestra de leucocitaféresis humana obtenida de un sujeto con leucemia linfocítica crónica (LLC) se incubaron, transdujeron y cultivaron mediante el proceso ilustrativo descrito en el Ejemplo I. Se generaron composiciones de linfocitos T CD4+ modificados genéticamente y linfocitos T CD8+ modificados genéticamente, cada uno de los cuales expresa el mismo CAR anti-CD19.

### **Ejemplo 5: Adquisición de imágenes continuas en línea para la determinación de la viabilidad celular durante el cultivo.**

Se obtuvieron diversos parámetros ópticos de los linfocitos T en proceso de modificación genética para la expresión de un receptor recombinante mediante microscopía de holografía digital (DHM) diferencial en línea. La DHM diferencial permite obtener imágenes de células sin etiquetas, con imágenes de alto contraste para la segmentación de objetos, y obtención de una pluralidad de rasgos distintivos ópticos o morfológicos que describen cuantitativamente los objetos fotografiados, por ejemplo, para determinar el recuento y la viabilidad de las células.

Linfocitos T primarios de donantes humanos sanos se modificaron genéticamente para que expresaran un receptor de antígeno quimérico (CAR) anti-CD19 mediante un proceso de modificación genética ilustrativo, generalmente como se describe en el Ejemplo 1 anterior. Se realizaron dos experimentos: Experimento 1 con dos análisis experimentales de linfocitos CD4+ de dos donantes sanos diferentes (Donante 1 o Donante 2), y Experimento 2 con un análisis experimental, cada uno de linfocitos CD4+ y linfocitos CD8+ de un tercer donante (Donante 3). Las células se cultivaron para su expansión mediante transferencia a un biorreactor (p. ej., un biorreactor de movimiento oscilante). El cultivo incluyó la sustitución de medios con perfusión semicontinua y mezcla continua.

Las imágenes holográficas y los parámetros ópticos de las células se capturaron de forma continua hasta aproximadamente 120 horas de cultivo utilizando un sistema de adquisición de imágenes DHM diferencial en línea ("continuo"), por ejemplo, un Ovizio iLine F (Ovizio Imaging Systems NV/SA, Bruselas, Bélgica). El sistema de DHM diferencial en línea contenía un sistema de tubos desechables conectado al biorreactor de forma que una muestra pudiera fluir desde el biorreactor, a través del sistema de tuberías, donde un sistema de adquisición de imágenes capta imágenes holográficas y parámetros ópticos de las células que viajan a su través, y devuelve la muestra al biorreactor. La viabilidad celular y el recuento de células viables (RCV) se determinaron a partir de las imágenes. La viabilidad de las células modificadas genéticamente también se comparó con los resultados obtenidos mediante muestreo manual ("manual") y recuento celular con un contador celular automatizado, muestreadas en varios puntos temporales hasta aproximadamente 120 horas de cultivo. Los dos métodos se compararon basándose en el análisis del curso temporal y la regresión lineal.

Las Figuras 2A-2D muestran la comparación del recuento de células viables (RCV) y la viabilidad, evaluados mediante monitorización continua por DHM diferencial o muestreo manual, en linfocitos CD4+ del Donante 1 del Experimento 1 (Figura 2A), Experimento 1 Donante 2 (Figura 2B) o Experimento 2 Donante 3 (Figura 2C), o linfocitos CD8+ del Experimento 2 Donante 3 (Figura 2D). El R2 y la pendiente de la comparación se muestran en la Tabla E2

siguiente.

**Tabla E2.**  $R^2$  y pendiente de comparación entre métodos de muestreo.

Experimento	$R^2$		pendiente	
	RCV	Viabilidad	RCV	Viabilidad
Experimento 1, Donante 1, CD4+	0,98	0,99	1,29	1,02
Experimento 1, Donante 2, CD4+	0,98	1,00	1,49	1,01
Experimento 2, Donante 3, CD4+	0,71	0,92	1,11	0,98
Experimento 2, Donante 3, CD8+	0,99	0,99	1,49	0,95

- 5 Los resultados mostraron que el RCV y la viabilidad como monitorización continua y muestreo manual estaban altamente correlacionados, para linfocitos CD4+ y CD8+ y células de diferentes donantes. Los resultados fueron coherentes con la utilidad de la monitorización continua mediante DHM diferencial durante el cultivo para la expansión de las células en el proceso de modificación genética celular.

10 **Ejemplo 6: Comparación de la expansión manual y automatizada mediante la adquisición continua de imágenes en línea.**

Un método de expansión celular totalmente automatizado, sin operador, con monitorización continua de las células mediante imágenes en línea y perfusión automatizada, se comparó con un método de expansión manual.

- 15 Se activaron linfocitos T primarios de un donante humano sano y se transdujeron con un vector para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) ilustrativo, mediante un proceso de modificación genética ilustrativo. Después de la transducción, las células se combinaron y se inocularon en dos cultivos diferentes, una expansión automatizada basada en imágenes continuas en línea utilizando DHM diferencial, y un método de expansión manual.

- 20 En el cultivo de expansión automatizada, las células se cultivaron en un biorreactor de movimiento oscilante, con sustitución de medios con perfusión y mezcla continua. La viabilidad celular y el recuento de células viables (RCV) se monitorizaron mediante un sistema de imagen DHM diferencial automatizado, generalmente como se describe en el Ejemplo 5 anterior. El RCV inicial en el momento de la inoculación fue similar para ambos cultivos ( $0,12 \times 10^6$  células/ml para el cultivo automatizado,  $0,14 \times 10^6$  células/ml para el cultivo manual). La perfusión en la expansión automatizada se basó en un promedio móvil de cuatro horas de RCV calculado mediante un algoritmo de software, donde se requería un promedio de RCV superior al RCV objetivo para la progresión del método. El RCV objetivo era de  $0,6 \times 10^6$  células/ml,  $1 \times 10^6$  células/ml y  $4 \times 10^6$  células/ml para 3 etapas de perfusión. No se produjo ninguna intervención adicional del operador tras la inoculación. En el cultivo de expansión manual, la perfusión se realizó basándose en el muestreo manual y la evaluación del RCV, con un determinado volumen de medio añadido tras alcanzar un RCV umbral. También se evaluó la expresión de marcadores en la superficie celular de las células mediante citometría de flujo.

- 35 Como se muestra en la **Figura 3**, se observó un mayor crecimiento de linfocitos T con el sistema de expansión automatizado. La viabilidad celular evaluada mediante adquisición de imágenes por DHM diferencial continua, y fenotipos celulares, evaluado mediante citometría de flujo, fueron similares entre los procesos de expansión automatizados y manuales.

- 40 Los resultados fueron coherentes con la utilidad de la adquisición de imágenes por DHM continua y el proceso de expansión automatizado, para el cultivo y monitorización de células durante un proceso de modificación genética de linfocitos T, sin necesidad de un operador humano. En algunos aspectos, dicho método puede utilizarse para determinar la cinética de crecimiento de los linfocitos T primarios, y determinar el momento de la cosecha de las células para la modificación genética para la administración.

- 45 La presente invención no pretende limitar su alcance a las realizaciones particulares desveladas, que se proporcionan, por ejemplo, para ilustrar diversos aspectos de la invención. Diversas modificaciones de las composiciones y métodos descritos resultarán evidentes a partir de la descripción y enseñanzas del presente documento.

## SECUENCIAS

SEQ ID NO.	SECUENCIA	DESCRIPCIÓN
1	ESKYGPPCPPCP	espaciador (bisagra de IgG4) (aa) Homo sapiens
2	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCTTGCCT	espaciador (bisagra de IgG4) (nt) Homo sapiens
3	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLGLK	Bisagra-CH3 espaciador Homo sapiens
4	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVLEFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVQLHQLDNLG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDK SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK	Bisagra-CH2-CH3 espaciador Homo sapiens
5	RWPESPKAQASSVPTAQPAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEKKKEKE KEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSD LKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHNSGQSQSRLTLPRSLWNAGT SVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAPVKSLLNLLASSDPPEAASWLLC EVSGFSPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPGSTTFWAWSVLRVP APPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSIVTDH	IgD-bisagra-Fc Homo sapiens
6	LEGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR	T2A artificial
7	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIIPKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFK NCTSIGDLHLIPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQA WPNRTDLHAFENLEIIRGRKQHGQFSLAVSLNITSLGLRSLKEISD GDVILISGNKLCYANTINWKKLFGTSGQTKIISNRGENSCKATGQVCH ALCSPEGCGWPEPRDCVSCRNVSRGECVDKCNLLEGEPREFVENSECI QCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNT LVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNTNGPKIPSIATGMVGAL LLLLVVALGIGLFM	tEGFR artificial
8	FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (aminoácidos 153-179 del N.º de referencia P10747) Homo sapiens
9	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWVLVVGGV LACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (aminoácidos 114-179 del N.º de referencia P10747) Homo sapiens
10	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28 (aminoácidos 180-220 de P10747) Homo sapiens
11	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28 (LL a GG) Homo sapiens
12	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCEL	4-1BB (aminoácidos 214-255 de Q07011.1) Homo sapiens
13	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKP RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATK DTYDALHMQALPPR	CD3 zeta Homo sapiens
14	RVKFSRSAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKP RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATK DTYDALHMQALPPR	CD3 zeta Homo sapiens
15	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKP RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATK DTYDALHMQALPPR	CD3 zeta Homo sapiens



(continuación)

SEQ ID NO.	SECUENCIA	DESCRIPCIÓN
16	RKVCNGIGIGIEFKDSLSINATNIKHFKNCTSI SGDLHILPVAFRGDSFT IITPFLDPQELDLKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRK QHGGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDV IISGNKNLCYANTINWKKL FGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCGWGEPRDCVSCRNV SRGRECVDKCNLLEGEPRFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDN CIQCAHYIDGPHCVKTCFAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYG CTGPGLEGCPNTPGPKIPSIATGMVGA LLLLLLVVALGIGLGM	tEGFR artificial
17	EGRGSLTTCGDVEENPGP	T2A artificial
18	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
19	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
20	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
21	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A
22	PGGG-(SGGGG)5-P- en donde P es prolina, G es glicina y S es serina	Enlazador ilustrativo
23	GSADDAKKDAKKDGKS	Enlazador ilustrativo
24	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	Enlazador ilustrativo
25	Glu Val Val Val Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Bisagra de IgG ilustrativa
26	X1PPX2P X1 es glicina, cisteína o arginina X2 es cisteína o treonina	Bisagra de IgG ilustrativa
27	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro	Bisagra de IgG ilustrativa
28	Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro	Bisagra de IgG ilustrativa
29	ELKTPGLDTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPK SCDTPPPCPRCP	Bisagra de IgG ilustrativa
30	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro	Bisagra de IgG ilustrativa
31	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Bisagra de IgG ilustrativa
32	Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Bisagra de IgG ilustrativa
33	Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Bisagra de IgG ilustrativa
34	QQGNTLPYT	CDR L3
35	RASQDISKYL N	CDR L1
36	SRLHSGV	CDR L2
37	GNTLPYTFG	CDR L3
38	DYGVS	CDR H1
39	VIWGSETTYNSALKS	CDR H2
40	YAMDYWG	CDR H3
41	EVKLQESGPGVLVAPQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGS ETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTD DTAIYYCAKHYYYGGSYAMD YWGQGSTVTVSS	VH
42	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYL N WYQQKPDGTVKLLIYHTSRL HSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQED IATYFCQQGNTLPYTFGGGT KLEIT	VL
43	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYL N WYQQKPDGTVKLLIYHTSRL HSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQED IATYFCQQGNTLPYTFGGGT KLEITG STSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGVLVAPQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWI RQPPRKGLFWLGVTVGSETTYNSAL KSRLLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTD DTA IYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGSTVTVSS	scFv
44	KASQNVGTNVA	CDR L1
45	SATYRNS	CDR L2
46	QQYNRYPYT	CDR L3
47	SYWMN	CDR H1
48	QIYPGDGDTNYNGKFKG	CDR H2
49	KTISSVVDYFYDY	CDR H3

(continuación)

SEQ ID NO.	SECUENCIA	DESCRIPCIÓN
50	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNVKQRPQGQGLEWIGQIYPG DGDINYNKFKQGATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISVVDY FDYWGQGTITVTVSS	VH
51	DIETLTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTINVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYR NSGVDPDRFTGSGSGTDFTLTITINVSQKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKR	VL
52	GGGGSGGGSGGGGS	Enlazador
53	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNVKQRPQGQGLEWIGQIYPG DGDINYNKFKQGATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISVVDY FDYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIETLTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKA SQNVGTINVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVDPDRFTGSGSGTDFTLTITINVS SKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKR	scFv
54	HYYYGGSYAMDY	CDR H3
55	HTSRLHS	CDR L2
56	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	Enlazador
57	gacatccagatgacccagaccacctccagcctgagcgccagcctggggcagccgg gtgacccatcagctgcccgggcccagccaggacatcagcaagtaacctgaactgggtat cagcagaagcccgcagcgccacggtcaagctgctgatctaccacaccagccggctg cacagcggtgctgcccagccggttttagcggcagcggtccggcaccgactacagc ctgacccatctccaaacctggaacaggaagatatcgccacctacttttgccagcag ggcaacacactgcccacacctttggcggcggaacaaagctggaaatcacccggc agcaccctccggcagcgccaaagcctggcagcgccgagggcagcaccagggcgag gtgaagctgcaggaaagcgccctggcctgggtggccccagccagagcctgagc gtgacctgcacccgtgagcggtgagcctgcccgaactacggcgtgagctggatc cggcagccccccaggaaggcctggaatggctggcggtgatctggggcagcgag accacctactacaacagcgccctgaagagccggctgacctcatcaaggacaac agcaagagccagggtgttcctgaagatgaacagcctgcagaccgacgacacccgc atctactactgcccgaagcaactactactacggcggcagctacgcatggactac tggggccagggcaccagcgtgacctgagcagc	Secuencia que codifica scFv
58	MPLLLLLPLWAGALA	Péptido señal CD33
59	MALPVTALLPLALLHA	Péptido señal CD8 alfa
60	atgctctcctggtgacaagcctctgctctgtgagttaccacaccagcattc ctctgatcca	Secuencia de señal de la cadena alfa del GMCSFR
61	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP	Secuencia de señal de la cadena alfa del GMCSFR

# REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una composición de células modificadas genéticamente, comprendiendo el método:

5 (a) incubar, en condiciones de estimulación, una composición de entrada que comprende linfocitos T enriquecidos con linfocitos T humanos primarios CD4+, comprendiendo dichas condiciones de estimulación la presencia de:

- 10 (i) un reactivo estimulador, en donde el reactivo estimulador comprende un agente primario que se une específicamente a un miembro de un complejo TCR, y comprende además un agente secundario que se une específicamente a una molécula coestimuladora de linfocitos T; y  
(ii) citocinas que comprenden IL-2, IL-7 e IL-15 humanas recombinantes, y  
(iii) uno o más antioxidantes;

15 generando así una composición estimulada;  
en donde la composición de entrada comprende más de o más de aproximadamente el 70 %, más de o más de aproximadamente el 75 %, más de o más de aproximadamente el 80 %, más de o más de aproximadamente el 85 %, más de o más de aproximadamente el 90 %, más de o más de aproximadamente el 95 % o más de o más de aproximadamente el 98 % de linfocitos T humanos primarios CD4+; y/o la composición de entrada consiste esencialmente en linfocitos T humanos primarios CD4+;

20 (b) introducir un receptor recombinante en la composición estimulada, generando así una composición modificada genéticamente que comprende linfocitos T modificados genéticamente; y

(c) cultivar la composición modificada genéticamente en condiciones que promuevan la proliferación o la expansión de las células modificadas genéticamente, produciendo así una composición de salida que comprende los linfocitos T modificados genéticamente, y en donde:

- 25 el cultivo se realiza en presencia de citocinas que comprenden IL-2, IL-7 e IL15 humanas recombinantes;  
el cultivo se realiza en presencia de un tensioactivo;  
al menos una parte del cultivo se realiza con perfusión; y  
el cultivo se realiza al menos hasta que la composición de salida comprende un número umbral de linfocitos T.

30 2. El método de la reivindicación 1, en donde:

- i) la concentración de IL-2 recombinante en la incubación de la etapa (a) es de 10 UI/ml a 200 UI/ml, o de aproximadamente 10 UI/ml a aproximadamente 200 UI/ml; y/o  
35 ii) en donde la concentración de IL-7 en la incubación de la etapa (a) es de 100 UI/ml a 1000 UI/ml o de aproximadamente 100 UI/ml a aproximadamente 1000 UI/ml y/o la concentración de IL-15 en la etapa de incubación (a) es de 1 UI/ml a 50 UI/ml o de aproximadamente 1 UI/ml a aproximadamente 50 UI/ml.

40 3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el agente primario que se une específicamente a un miembro de un complejo TCR se une específicamente a CD3; opcionalmente en donde:

- i) el agente secundario que se une específicamente a una molécula coestimuladora de linfocitos T se une específicamente a una molécula coestimuladora seleccionada de CD28, CD137(4-1-BB), OX40 o ICOS; y/o  
45 ii) los agentes primario y/o secundario comprenden un anticuerpo, opcionalmente, en donde el reactivo estimulador comprende la incubación con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28, o un fragmento de unión a antígeno de los mismos.

50 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el agente primario y/o el agente secundario están presentes en la superficie de un soporte sólido; opcionalmente, en donde el soporte sólido es o comprende una perla; opcionalmente en donde además:

- i) la proporción entre perlas y células es menos de o menos de aproximadamente 3:1; y/o  
ii) la proporción entre perlas y células es de 2:1 a 0,5:1, o de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 0,5:1; y/o  
55 iii) la proporción entre perlas y células es de o aproximadamente 1:1.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde:

- i) el uno o más antioxidantes comprenden un antioxidante que contiene azufre; y/o  
ii) el uno o más antioxidantes comprenden un precursor del glutatión; y/o  
60 iii) el uno o más antioxidantes comprenden N-acetil cisteína (NAC), opcionalmente en donde la NAC está en una concentración de 0,2 mg/ml a 2,0 mg/ml, o de aproximadamente 0,2 mg/ml a aproximadamente 2,0 mg/ml.

6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la introducción comprende transducir células de la composición estimulada con un vector vírico que comprende un polinucleótido que codifica el receptor recombinante; opcionalmente en donde:

65

- i) el vector vírico es un vector retrovílico; y/o
- ii) el vector vírico es un vector lentivírico o un vector gammaretrovírico; y/o
- iii) la introducción se lleva a cabo en presencia de un adyuvante de la transducción; opcionalmente, en donde el adyuvante de la transducción es o comprende:

- a) sulfato de protamina, opcionalmente de 1 µg/ml a 50 µg/ml o de aproximadamente 1 µg/ml a aproximadamente 50 µg/ml de sulfato de protamina;
- b) un adyuvante de la transducción derivado de la fibronectina; y/o
- c) RetroNectin.

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el reactivo estimulador se elimina de la composición modificada genéticamente antes del cultivo; opcionalmente en donde:

- i) el reactivo estimulador se elimina en un plazo igual o inferior a 7 días después del inicio de la incubación; y/o
- ii) el reactivo estimulador se elimina de 3 días a 6 días o de aproximadamente 3 días a aproximadamente 6 días después del inicio de la incubación; y/o
- iii) el reactivo estimulador se elimina a los o aproximadamente los 4 días después del inicio de la incubación; y/o
- iv) la eliminación de las perlas comprende la exposición de las células de la composición modificada genéticamente a un campo magnético.

8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la concentración de IL-2 en el cultivo de la etapa (c) es de 50 UI/ml a 500 UI/ml o de aproximadamente 50 UI/ml a aproximadamente 500 UI/ml; y/o en donde la concentración de IL-7 en el cultivo de la etapa (c) es de 500 UI/ml a 2000 UI/ml o de aproximadamente 500 UI/ml a aproximadamente 2000 UI/ml; y/o la concentración de IL-15 en el cultivo de la etapa (c) es de 5 UI/ml a 50 UI/ml o de aproximadamente 5 UI/ml a aproximadamente 50 UI/ml.

9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde:

- i) al menos una parte del cultivo de la etapa (c) se realiza con mezcla continua; y/o
- ii) el cultivo en la etapa (c) se lleva a cabo en presencia de un tensioactivo que comprende un poloxámero, opcionalmente, en donde el poloxámero está presente en una concentración de 0,5 µl/ml a 5 µl/ml o de aproximadamente 0,5 µl/ml a aproximadamente 5 µl/ml; además, opcionalmente, el poloxámero es el Poloxámero 188.

10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde:

- i) el cultivo en la etapa (c) se continúa durante al menos un día después de alcanzar el número umbral de linfocitos T; y/o
- ii) el número umbral de linfocitos T es al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces o más mayor que el número de la composición de células modificadas genéticamente antes del cultivo; y/o
- iii) el cultivo en la etapa (c) se realiza durante 2 días a 10 días inclusive.

11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde, tras el cultivo en la etapa (c), el método comprende además la recogida de células de la composición de salida; opcionalmente en donde:

- i) el tiempo transcurrido entre el inicio de la incubación y la recogida de células de la composición de salida es de 7 días a 15 días o de aproximadamente 7 días a aproximadamente 15 días; y/o
- ii) el tiempo transcurrido entre el inicio de la incubación y la recogida de células de la composición de salida es de 9 días a 13 días o de aproximadamente 9 días a aproximadamente 13 días; y/o
- iii) el tiempo transcurrido entre el inicio de la incubación y la recogida de células de la composición de salida es de 8 días a 13 días o de aproximadamente 8 días a aproximadamente 13 días.

12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende además formular células de la composición de salida para su crioconservación y/o administración a un sujeto, opcionalmente en presencia de un excipiente farmacéuticamente aceptable; opcionalmente

en donde las células de la composición de salida se formulan en presencia de un crioprotector; opcionalmente además en donde el crioprotector comprende DMSO.

13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, que comprende además aislar los linfocitos CD4<sup>+</sup> de una muestra biológica antes de la incubación; opcionalmente en donde:

- i) el aislamiento comprende, seleccionar células en función de la expresión superficial de CD4, opcionalmente mediante selección positiva o negativa; y/o
- ii) el aislamiento comprende llevar a cabo la selección por inmunofluorescencia.

14. El método de la reivindicación 13, en donde:

- i) la muestra biológica comprende linfocitos T primarios obtenidos de un sujeto; opcionalmente en donde el sujeto es un sujeto humano; o
- ii) la muestra biológica es o comprende una muestra de sangre total, una muestra de capa leucocitaria, una muestra de células mononucleares de sangre periférica (CMSP), una muestra de linfocitos T sin fraccionar, una muestra de linfocitos, una muestra de glóbulos blancos, un producto de aféresis o un producto de leucocitaféresis.

15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde el receptor recombinante es capaz de unirse a un antígeno diana asociado a, específico de y/o expresado en una célula o tejido de una enfermedad, un trastorno o una afección; opcionalmente en donde:

- i) la enfermedad, el trastorno o la afección es una enfermedad o un trastorno infecciosos, una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria, un tumor o un cáncer; y/o
- ii) el antígeno diana es un antígeno tumoral; y/o
- iii) el antígeno diana se selecciona de 5T4, 8H9, avb6 integrina, B7-H6, antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA), CA9, un antígeno de cáncer testicular, anhidrasa carbónica 9 (CAIX), CCL-1, CD19, CD20, CD22, CEA, antígeno de superficie de la hepatitis B, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD138, CD171, antígeno carcinoembrionario (CEA), CE7, una ciclina, ciclina A2, c-Met, antígeno doble, EGFR, glucoproteína 2 epitelial (EPG-2), glucoproteína 40 epitelial (EPG-40), EPHA2, ephrinB2, erb-B2, erb-B3, erb-B4, dímeros erbB, EGFR VIII, receptor de estrógenos, AchR fetal, receptor alfa de folato, proteína fijadora de folato (FBP), FCRL5, FCRH5, receptor de acetilcolina fetal, G250/CAIX, GD2, GD3, gp100, receptor 5D acoplado a proteína G (GPCR5D), Her2/neu (receptor tirosina quinasa erbB2), HMW-MAA, IL-22R-alfa, receptor IL-13 alfa 2 (IL-13Ra2), receptor del dominio de inserción de la quinasa (kdr), cadena ligera kappa, Lewis Y, molécula de adhesión de células L1 (L1-CAM), antígeno asociado a melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MART-1, mesotelina, CMV murina, mucina 1 (MUC1), MUC16, NCAM, NKG2D, ligandos de NKG2D, NY-ESO-1, GD2 O-acetilado (OGD2), antígeno oncofetal, antígeno preferentemente expresado del melanoma (PRAME), PSCA, receptor de progesterona, survivina, ROR1, TAG72, tEGFR, receptores de VEGF, VEGF-R2, proteína del tumor de Wilms 1 (WT-1), un antígeno específico de patógenos y un antígeno asociado a una etiqueta universal.

16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde:

- i) el receptor recombinante es o comprende un receptor de antígeno funcional no TCR o un TCR o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y/o
- ii) el receptor recombinante es un receptor de antígeno quimérico (CAR); y/o
- iii) el receptor recombinante es un CAR anti-CD19.

17. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en donde el método se realiza en menos de 21 días, inclusive.

18. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en donde la composición de entrada es una primera composición de entrada que comprende linfocitos T enriquecidos con linfocitos T humanos primarios CD4+ y la composición estimulada es una primera composición estimulada, en donde el método comprende, además:

- (d) incubar por separado, en condiciones de estimulación, una segunda composición de entrada que comprende linfocitos T enriquecidos con linfocitos T humanos primarios CD8+, en donde:

la segunda composición de entrada comprende más de aproximadamente el 70 %, más de o más de aproximadamente el 75 %, más de o más de aproximadamente el 80 %, más de o más de aproximadamente el 85 %, más de o más de aproximadamente el 90 %, más de o más de aproximadamente el 95 % o más de o más de aproximadamente el 98 % de linfocitos T humanos primarios CD8+; y/o la segunda composición de entrada consiste esencialmente en linfocitos T humanos primarios CD8+; y los linfocitos T enriquecidos con linfocitos T humanos primarios CD8+ se aíslan de la misma muestra biológica que los linfocitos T enriquecidos con linfocitos T humanos primarios CD4+; y las condiciones de estimulación comprenden la presencia de (i) un reactivo estimulador que comprende un agente primario que se une específicamente a un miembro de un complejo TCR y que comprende además un agente secundario que se une específicamente a una molécula coestimuladora de linfocitos T y (ii) una o más citocinas, generando así una segunda composición estimulada; y

- (e) introducir un receptor recombinante en la segunda composición estimulada, generando así una segunda composición modificada genéticamente que comprende linfocitos T modificados genéticamente; y
- (f) cultivar la segunda composición modificada genéticamente en condiciones que promuevan la proliferación o la expansión de las células modificadas genéticamente, produciendo así una segunda composición de salida que comprende los linfocitos T modificados genéticamente.

19. El método de la reivindicación 18, en donde la una o más citocinas utilizadas para las condiciones de estimulación

de la segunda composición de entrada se seleccionan de IL-2 recombinante e IL-15 recombinante, opcionalmente en donde:

- 5 i) la concentración de IL-2 recombinante es de 10 UI/ml a 200 UI/ml; y/o
- ii) la concentración de IL-15 recombinante es de 1 UI/ml a 25 UI/ml.

20. El método de la reivindicación 18 o la reivindicación 19, en donde la introducción de un receptor recombinante en la segunda composición estimulada comprende la transducción de células de la segunda composición estimulada con un vector vírico que comprende un polinucleótido que codifica el receptor recombinante; opcionalmente en donde:

- 10 i) el vector vírico es un vector retrovírico; y/o
- ii) el vector vírico es un vector lentivírico o un vector gammaretrovírico; y/o
- iii) la introducción se lleva a cabo en presencia de un adyuvante de la transducción.

15 21. El método de cualquiera de las reivindicaciones 18-20, en donde el cultivo de la segunda composición modificada genéticamente se realiza al menos hasta que la segunda composición de salida incluye un número umbral de linfocitos T, opcionalmente en donde:

- 20 i) el cultivo de la segunda composición modificada genéticamente se continúa durante al menos un día después de alcanzar el número umbral de linfocitos T; y/o
- ii) el número umbral es al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces o más mayor que el número de la segunda composición de células modificadas genéticamente antes de cultivar la segunda composición modificada genéticamente.

25 22. El método de cualquiera de las reivindicaciones 18-21, en donde después de cultivar la segunda composición modificada genéticamente, el método comprende además la recogida de células de la segunda composición de salida; opcionalmente en donde:

- 30 i) el tiempo transcurrido entre el inicio de la incubación y la recogida de células de la segunda composición de salida es de 7 días a 15 días o de aproximadamente 7 días a aproximadamente 15 días; y/o
- ii) el tiempo transcurrido entre el inicio de la incubación y la recogida de células de la segunda composición de salida es de 9 días a 13 días o de aproximadamente 9 días a aproximadamente 13 días; y/o
- iii) el tiempo transcurrido entre el inicio de la incubación y la recogida de células de la segunda composición de salida es de 8 días a 13 días o de aproximadamente 8 días a aproximadamente 13 días.

35 23. El método de cualquiera de las reivindicaciones 18-22, en donde el método comprende además formular células de la segunda composición de salida para su criopreservación y/o administración a un sujeto, opcionalmente en presencia de un excipiente farmacéuticamente aceptable; opcionalmente

- 40 en donde las células de la segunda composición de salida se formulan en presencia de un crioprotector; opcionalmente además
- en donde el crioprotector comprende DMSO.

45 24. El método de cualquiera de las reivindicaciones 18-23, en donde el receptor recombinante que se introduce en la segunda composición estimulada es el mismo receptor recombinante, opcionalmente el CAR, opcionalmente el CAR anti-CD19, que se introduce en la primera composición estimulada.

50 25. El método de cualquiera de las reivindicaciones 18-24, en donde la segunda composición de salida que comprende el número umbral o número mayor de células se produce entre más de o más de aproximadamente el 85 %, más de o más de aproximadamente el 90 % o más de o más de aproximadamente el 95 % de las iteraciones del método.

26. El método de cualquiera de las reivindicaciones 18-25, en donde el método se realiza en menos de 21 días, ambos inclusive.

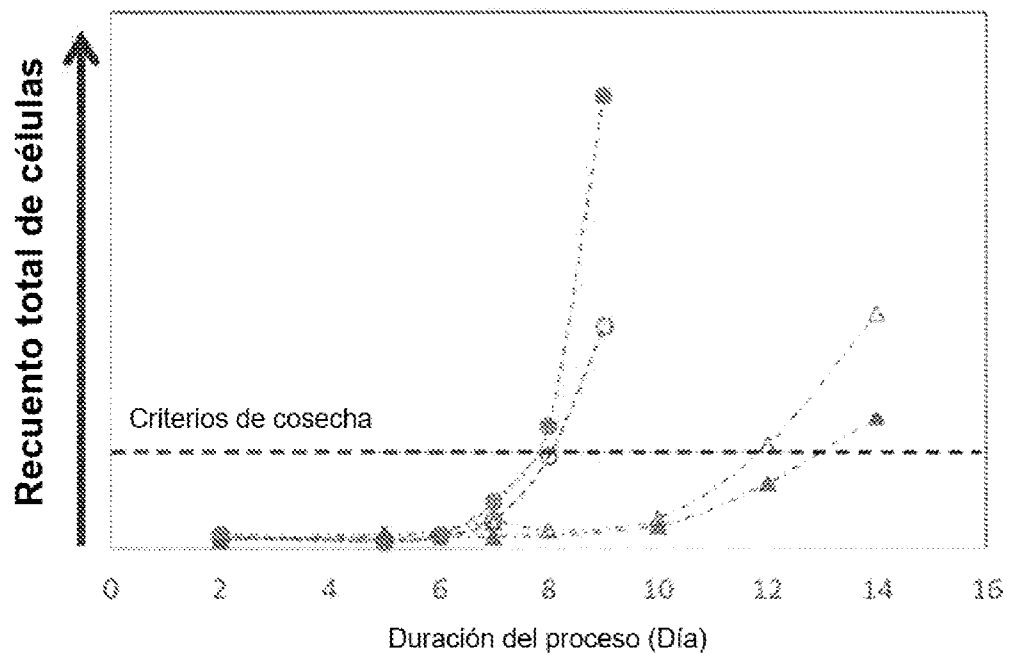
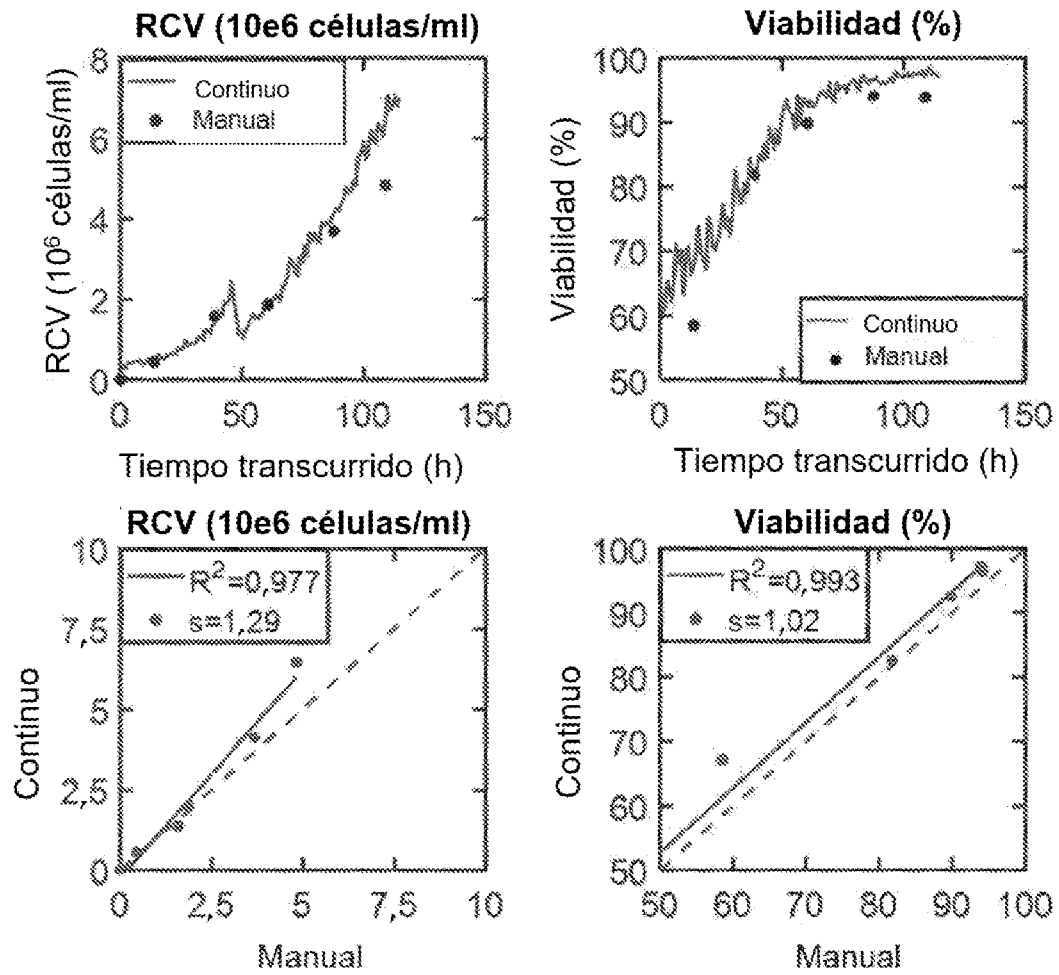


FIG. 1

FIG. 2A





**FIG. 2B**

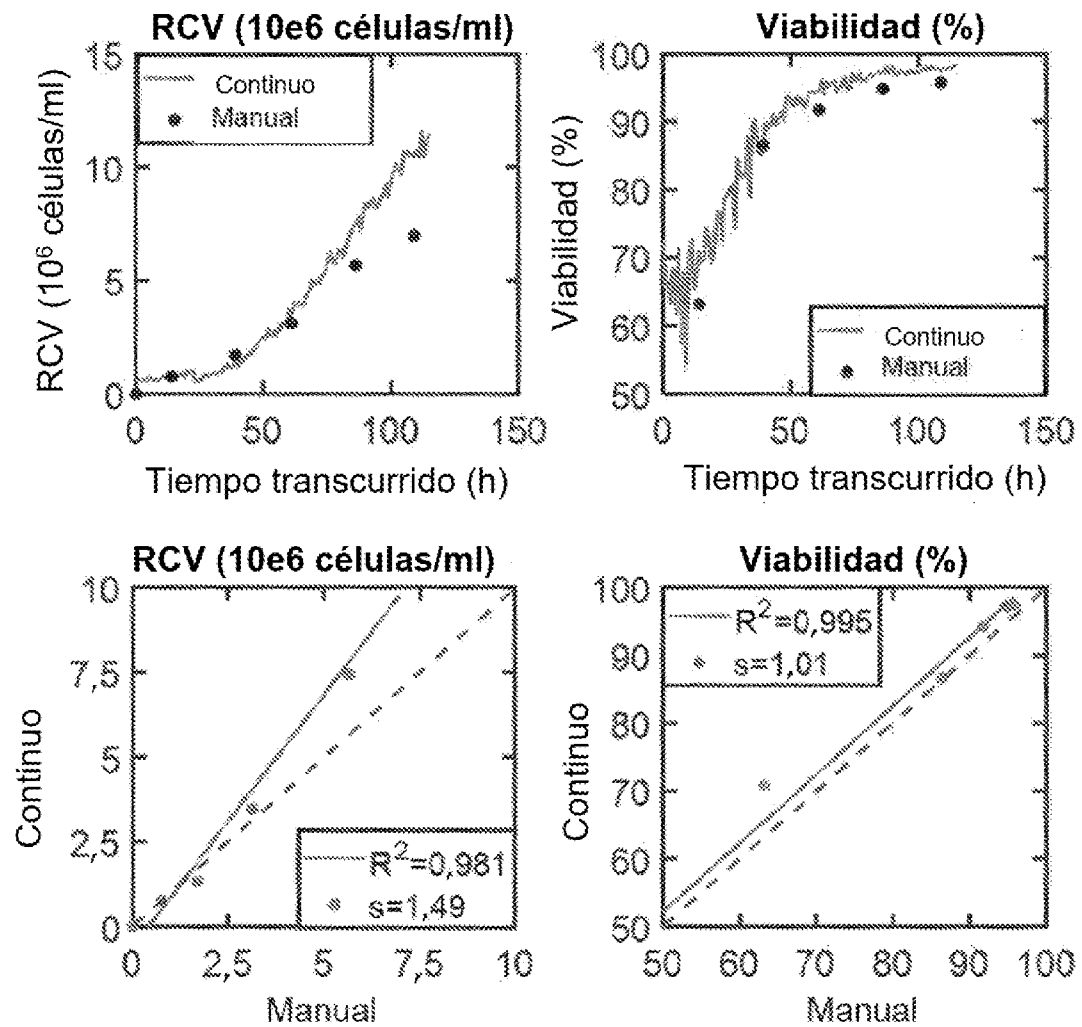
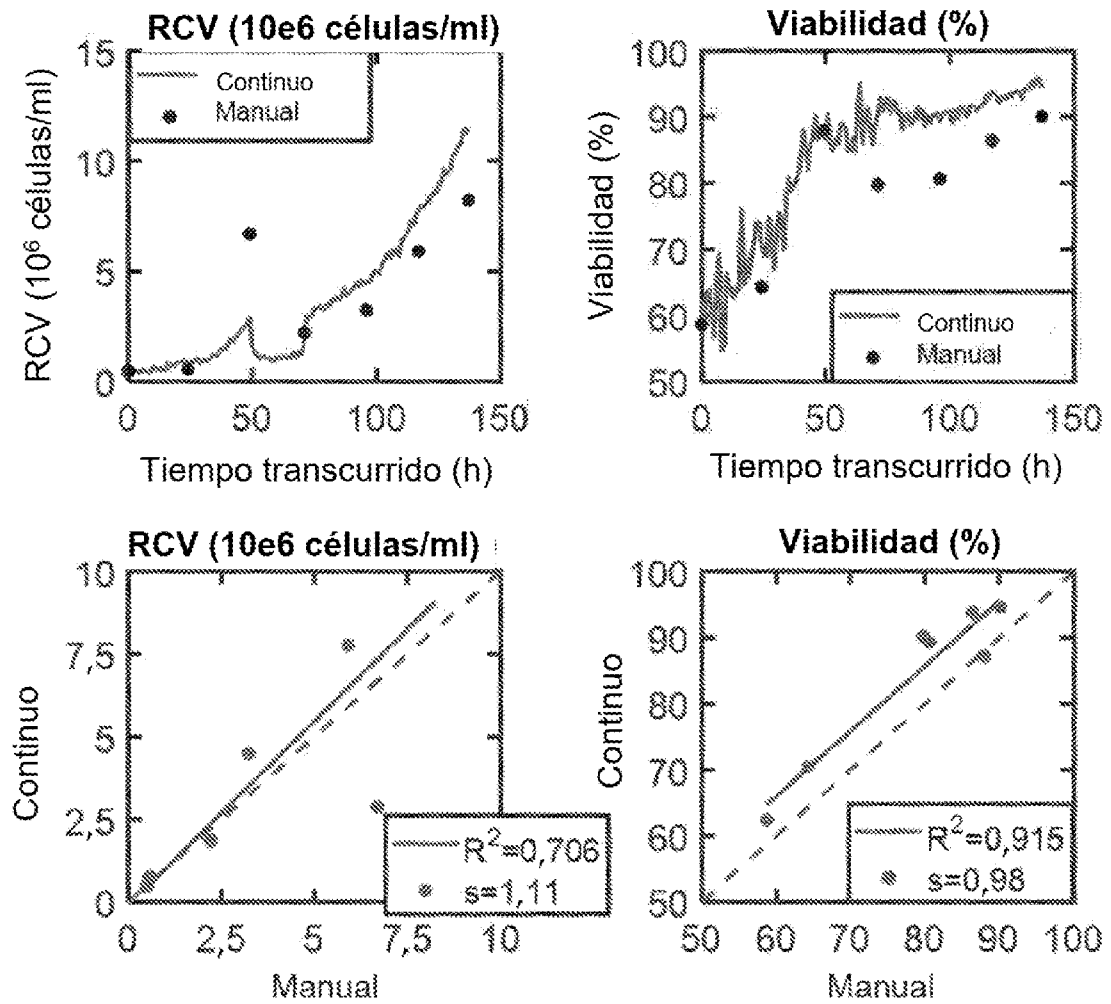
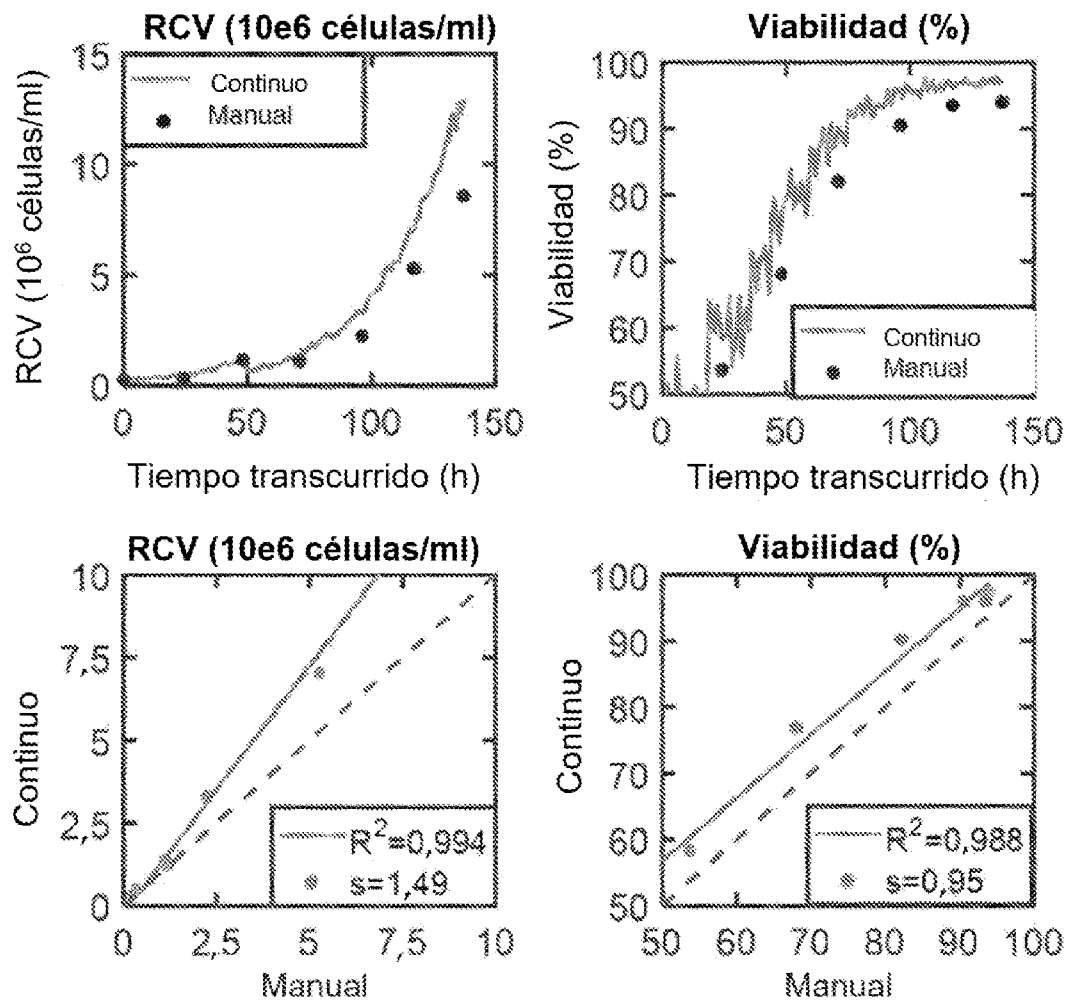


FIG. 2C



**FIG. 2D**



**FIG. 3**

