

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 995 052**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0781 (2010.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.2015** **E 23164036 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2024** **EP 4219687**

54 Título: **Métodos para aislar, cultivar y modificar por ingeniería genética poblaciones de células inmunitarias para terapia adoptiva**

30 Prioridad:

23.04.2014 US 201461983415 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.02.2025

73 Titular/es:

JUNO THERAPEUTICS, INC. (100.00%)
400 Dexter Ave. N, Suite 1200
Seattle, WA 98109, US

72 Inventor/es:

RAMSBORG, CHRIS;
BONYHADI, MARK, L;
CHAN, CALVIN y
BEAUCHESNE, PASCAL

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 2 995 052 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

Métodos para aislar, cultivar y modificar por ingeniería genética poblaciones de células inmunitarias para terapia adoptiva

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica la prioridad respecto de la solicitud provisional de los EE. UU. N.º 61/983.415, presentada el 23 de abril de 2014.

Listado de secuencias

La presente solicitud se presenta junto con un listado de secuencias en formato electrónico. El listado de secuencias se proporciona como un archivo titulado 735042000240seqlist.txt, creado el 22 de abril de 2015, que tiene un tamaño de 13 kilobytes.

Campo

La presente divulgación se refiere, en algunos aspectos, a métodos, células y composiciones para preparar células, y a composiciones para modificación por ingeniería genética y terapia celular. En algunas realizaciones se proporcionan métodos de preparación de células simplificados, por ejemplo, para el aislamiento, procesamiento, incubación y modificación por ingeniería genética de células y poblaciones de células. También se proporcionan células y composiciones producidas mediante los métodos y métodos de su uso. Las células pueden incluir células inmunitarias, tales como linfocitos T, y generalmente incluyen una pluralidad de poblaciones de linfocitos T aisladas o subtipos de linfocitos T. En algunos aspectos, los métodos son capaces de preparar una pluralidad de diferentes poblaciones celulares para terapia adoptiva usando menos etapas y/o recursos y/o una manipulación reducida en comparación con otros métodos.

Antecedentes

Existen diversos métodos disponibles para preparar células para su uso terapéutico. Por ejemplo, hay disponibles métodos para el aislamiento, el procesamiento y la modificación por ingeniería de células, incluyendo linfocitos T y otras células inmunitarias. Hay disponibles métodos para aislar dichas células y para expresar receptores de antígenos modificados por ingeniería genética, tales como receptores de linfocitos T (TCR, por sus siglas en inglés) de alta afinidad y receptores de antígenos quiméricos (CAR, por sus siglas en inglés). Existen métodos disponibles para transferir adoptivamente dichas células a sujetos. Se necesitan métodos mejorados para la preparación (por ejemplo, aislamiento, procesamiento, cultivo y modificación por ingeniería) de células para su uso en terapia celular. En particular, se necesitan métodos para la preparación y modificación por ingeniería de células, por ejemplo, una pluralidad de tipos o subtipos celulares aislados, con una eficiencia, una seguridad, una variabilidad y una conservación de recursos mejoradas. Se proporcionan métodos, células, composiciones, kits y sistemas que satisfacen dichas necesidades.

Stemberger C, Dreher S, Tschulik C, Piossek C, Bet J, Yamamoto TN, *et al.* (2012), *PLoS ONE* 7(4): e35798, describe cómo la tecnología de enriquecimiento positivo en serie novedosa permite la clasificación multiparamétrica clínica de células.

El documento WO 2009/072003 A2 describe un sistema y métodos de procesamiento de muestras.

El documento WO 2013/011011 A2 describe un método de tinción reversible de una célula diana.

El documento WO 2007/117602 A2 describe el aislamiento y el uso de linfocitos T reguladores humanos.

Sumario

La presente invención se define en el conjunto de reivindicaciones adjuntas.

En particular, la presente invención proporciona una composición que comprende una dosis de linfocitos T CD4+ y CD8+ modificados genéticamente para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria en un sujeto, en donde:

- (i) los linfocitos T CD4+ y CD8+ están en una relación entre 5:1 y 1:5;
- (ii) la dosis de linfocitos T CD4+ y CD8+ está entre 1×10^6 y 1×10^{11} células;
- (iii) los linfocitos T CD4+ y CD8+ se modificaron por ingeniería genética con un receptor de antígenos quimérico (CAR), en donde el CAR:

(a) reconoce un antígeno expresado por células de la enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria, en donde el antígeno es CD19;

(b) comprende un dominio de reconocimiento de antígeno extracelular y un dominio de señalización intracelular que comprende una secuencia que contiene ITAM y un dominio de señalización intracelular de una molécula

coestimuladora de linfocitos T; y

(iv) los linfocitos T CD4+ y CD8+ son de una muestra obtenida del sujeto con la enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria.

- 5 En algunas realizaciones, los linfocitos T CD4+ y CD8+ están en una relación entre 1:3 y 3:1.
- En algunas realizaciones, los linfocitos T CD4+ y CD8+ están en una relación entre 2:1 y 1:5.
- 10 En algunas realizaciones, la dosis de linfocitos T CD4+ y CD8+ está entre 1×10^6 y 1×10^9 células.
- En algunas realizaciones, la dosis de linfocitos T CD4+ y CD8+ está entre 1×10^6 y 25×10^6 células.
- En algunas realizaciones, la dosis de linfocitos T CD4+ y CD8+ es de 5×10^6 células.
- 15 En algunas realizaciones, la dosis de linfocitos T CD4+ y CD8+ es de 10×10^6 células.
- En algunas realizaciones, la dosis de linfocitos T CD4+ y CD8+ es de 20×10^6 células.
- 20 En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de sangre o derivada de sangre, opcionalmente en donde la muestra es una muestra de glóbulos blancos, una muestra de aféresis, una muestra de leucocitaféresis, una muestra de células mononucleares de sangre periférica y sangre completa.
- En algunas realizaciones, la muestra deriva de un producto de aféresis o de leucocitaféresis.
- 25 En algunas realizaciones, la enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en artritis, 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 una enfermedad o afección asociada al trasplante.
- 30 En algunas realizaciones, la enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria es LES.
- En algunas realizaciones, el CAR comprende un fragmento de anticuerpo monocatenario (scFV) que se une a CD19.
- 35 En algunas realizaciones, el dominio de señalización celular intracelular deriva de CD3zeta.
- En algunas realizaciones, el CAR incluye un dominio de señalización y/o una porción transmembrana de un receptor coestimulador, opcionalmente seleccionado de CD28, 4-1BB, OX40, DAP10 e ICOS.
- 40 Las células incluyen linfocitos T CD4+ y CD8+, como se hace referencia en las reivindicaciones. Las células están presentes en combinaciones de múltiples poblaciones celulares o tipos celulares, que se incluyen en las composiciones en relaciones o números particulares de las células o tipos celulares, como se define en las reivindicaciones.
- 45 En algunas realizaciones, las muestras son sangre y muestras derivadas de sangre, tales como muestras de glóbulos blancos, muestras de aféresis, muestras de leucocitaféresis, muestras de células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) y sangre completa.
- El receptor de antígenos modificado por ingeniería genética es o incluye un receptor de antígenos quimérico (CAR).
- 50 En algunos aspectos, el receptor se une específicamente a un antígeno expresado por células de una enfermedad o afección que ha de tratarse, como se define en las reivindicaciones. El CAR comprende un dominio de reconocimiento de antígeno extracelular. El CAR comprende un dominio de señalización intracelular que comprende una secuencia que contiene ITAM y un dominio de señalización intracelular de una molécula coestimuladora de linfocitos T.

55 Breve descripción de los dibujos

Figura 1A: proporciona una representación esquemática de una realización de un sistema cerrado para su uso en realizaciones de los métodos proporcionados. El sistema de ejemplo representado incluye una muestra de células 5, un depósito 6 de tampón de lavado, un depósito 7 de tampón de elución, un primer depósito 18 de Fab, un segundo depósito 19 de Fab y una bomba 8, conectados a través de una serie de tuberías y válvulas 13, a una primera columna de cromatografía 1 que contiene una primera matriz 3 unida operativamente a través de una serie de líneas de tuberías a una segunda columna de cromatografía 2 que contiene una segunda matriz 4. La segunda columna de cromatografía 2 se une operativamente a una cámara de extracción 9. La cámara de extracción 9 se une operativamente a una válvula 13, que dirige células y fluidos a un recipiente de desechos 10 o un vaso de cultivo 12 a través de una serie de líneas de tuberías. El sistema se encierra en una carcasa 14.

Figura 1B: proporciona una representación esquemática de una realización de un sistema cerrado para su uso en

realizaciones de los métodos proporcionados. El sistema de ejemplo representado incluye una muestra de células 5, un depósito 6 de tampón de lavado, un depósito 7 de tampón de elución, un primer depósito 18 de Fab, un segundo depósito 19 de Fab, un tercer depósito 20 de Fab y una bomba 8, conectados a través de una serie de tuberías a una primera columna de cromatografía 1 que contiene una primera matriz 3. Las válvulas 13 unidas operativamente a la serie de tuberías dirigen los fluidos a través de la serie de tuberías. Una válvula 13 unida operativamente a la primera columna de cromatografía 1 dirige las células y los fluidos a una segunda columna de cromatografía 2 que contiene una segunda matriz 4, que se une operativamente a una cámara de extracción 9. La válvula 13 unida operativamente a la primera columna de cromatografía 1 también dirige las células y los fluidos a una cámara de extracción 9, que se une operativamente a una tercera columna de cromatografía 15 que contiene una tercera matriz 16. La tercera columna de cromatografía 15 se une operativamente a una cámara de extracción 9. Las cámaras de extracción 9 se unen operativamente a un primer recipiente de desechos 10 o a un vaso de cultivo 12 a través de una serie de líneas de tuberías y válvulas 13. El sistema se encierra en una carcasa 14.

Descripción detallada

En algunos de los casos divulgados en el presente documento se describen realizaciones de la invención. Cualesquier referencias en el presente documento a métodos de tratamiento tienen por objeto referirse a productos para su uso en dichos métodos.

A menos que se defina otra cosa, se pretende que todos los términos de la técnica, las notaciones y otros términos o terminología técnicos y científicos 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, la definición expuesta en el presente documento prevalece sobre la definición referenciada.

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. Métodos y sistemas para aislar, cultivar y modificar por ingeniería células para terapia adoptiva

Se divulgan métodos de preparación de células, por ejemplo, linfocitos T, para su uso en ingeniería genética y métodos terapéuticos tales como terapia celular adoptiva. Específicamente, en algunos casos, los métodos usan o generan composiciones que contienen una pluralidad de diferentes poblaciones celulares o tipos de células, tales como poblaciones y subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ aisladas. En algunos casos, los métodos incluyen etapas para aislar una o más poblaciones celulares, generalmente una pluralidad de poblaciones celulares. Las células generalmente se aíslan de una muestra derivada de un sujeto.

En algunos casos, los métodos se realizan empleando selecciones o enriquecimientos simultáneos o secuenciales en los que se selecciona, se enriquece y/o se aísla una pluralidad de poblaciones de células diferentes, tales como linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺, a partir de una muestra, tal como una muestra que contiene linfocitos T humanos primarios. En algunos casos, dichos métodos se realizan usando una única corriente de procesamiento en la que una primera población de células, tales como células CD4⁺ o CD8⁺, y una segunda población de células, tales como las demás de las células CD4⁺ o CD8⁺, se seleccionan, enriquecen y/o aíslan sin descartar ninguna célula de la primera población antes de realizar la selección de la segunda población de células. En algunos casos, las selecciones primera y segunda pueden realizarse simultánea o secuencialmente. En algunos casos, los métodos de selección se realizan en forma de un único flujo de proceso realizando una primera selección para enriquecer una primera población de células, tal como una de las células CD4⁺ y CD8⁺ de una muestra, tal como una muestra que contiene linfocitos T humanos primarios, y usando las células sin seleccionar de la primera selección como fuente de células para una segunda selección, tal como para las demás de las células CD4⁺ o CD8⁺ de la muestra.

En algunos casos, puede realizarse una selección o selecciones adicionales de las primeras o segundas células seleccionadas. En algunos casos, la selección adicional enriquece en una subpoblación de células CD4⁺ o CD8⁺ que expresan un marcador en los linfocitos T de memoria central (T_{CM}) y/o enriquece en una subpoblación de células que expresan CD62L, CD45RA, CD45RO, CCR7, CD27, CD127 o CD44.

En algunos casos, los métodos de selección se realizan en un sistema o aparato cerrado. En algunos casos, dentro del sistema o aparato cerrado, se genera una composición, tal como una composición de inicio de cultivo, que contiene la población enriquecida o seleccionada de células, tal como ambas poblaciones de CD4⁺ y CD8⁺ enriquecidas o seleccionadas, en la misma composición.

Por ejemplo, en algunos casos, las una o más etapas se realizan con la pluralidad de poblaciones de células combinadas en la misma composición, o presentes en el mismo vaso, por ejemplo, en el mismo sistema o aparato cerrado, o en el mismo vaso, unidad o cámara, tal como la misma columna, por ejemplo, columna de separación magnética, tubo, conjunto de tuberías, cámara de cultivo, vaso de cultivo, unidad de procesamiento, vaso de separación de células, cámara de centrifugación o usando la misma matriz, medios y/o reactivos de separación, tales como la misma matriz, partícula o perla magnética o con respuesta magnética, el mismo soporte sólido, por ejemplo, soporte sólido marcado por afinidad y/o los mismos anticuerpos y/u otros compañeros de unión, tales como anticuerpos marcados con fluorescencia y compañeros de unión, para la pluralidad de poblaciones de células. En algunos casos, el uno o más vasos, unidades o cámaras, tales como columnas, se unen operativamente en el mismo sistema o aparato cerrado, de manera que los métodos de aislamiento, selección y/o enriquecimiento se producen en un único flujo de proceso en el que una población celular no seleccionada de una primera selección puede usarse como fuente de células para una segunda selección.

En algunos casos, el aislamiento o enriquecimiento en una o más poblaciones o subpoblaciones específicas de células, por ejemplo, linfocitos T CD4+ y CD8+ que se han de cultivar o modificar por ingeniería para terapia adoptiva, proporciona una o más ventajas. Por ejemplo, las células modificadas por ingeniería enriquecidas en una pluralidad de diferentes poblaciones celulares o tipos de células, tales como poblaciones y subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ aisladas, pueden mejorar la eficacia o reducir o evitar efectos no deseados. En algunos casos, el aislamiento o enriquecimiento aumenta la capacidad de las células administradas en última instancia a un sujeto para persistir, expandirse, activarse y/o injertarse *in vivo* o tras la administración a un sujeto. En algunos casos, mejora o aumenta una o más funciones efectoras o fenotipos de activación. Por ejemplo, en algunos casos, enriquecer una población de linfocitos T, tal como una población de linfocitos T CD8+, en células de memoria central (T_{CM}) puede proporcionar dichas ventajas. En algunos casos, una o más de dichas ventajas se divulgan mediante la combinación de dos o más poblaciones o subtipos aislados, tales como poblaciones o subpoblaciones aisladas de linfocitos T CD8+ y CD4+, tales como una población CD4+ y una población CD8+ enriquecida en T_{CM}. Por ejemplo, en algunos casos, dichas ventajas pueden conseguirse administrando una población CD4+ y CD8+ en comparación con una población CD8+ sola.

En algunos casos, los métodos incluyen el procesamiento de una composición generada que contiene una pluralidad de las poblaciones celulares aisladas o seleccionadas, tales como una población de células CD4+ y células CD8+ seleccionadas o enriquecidas. En un caso, el procesamiento de la composición generada incluye incubar las células en condiciones estimuladoras, por ejemplo, en algunos casos, para activar las células para la modificación por ingeniería o la transducción, o para la expansión celular. Los métodos, en algunos casos, incluyen etapas para modificar por ingeniería una pluralidad de tipos celulares, tales como células CD4+ y células CD8+, tales como los aislados y presentes en la composición incubada, tal como la composición de inicio de cultivo. En algunos casos, la modificación por ingeniería genética se realiza para introducir un receptor de antígenos modificado por ingeniería genética en las células, tal como un TCR, por ejemplo, un TCR de alta afinidad o un receptor de antígenos no TCR funcional, tal como un receptor de antígenos quimérico (CAR). En algunos casos, los métodos incluyen un procesamiento adicional, tal como incubación adicional, por ejemplo, a 37 °C ± 2 °C, o aproximadamente, y/o la formulación de células y composiciones que las contienen. En algunos casos, el procesamiento produce una composición de salida resultante que contiene células modificadas por ingeniería genética, tales como células CD4+ y CD8+ modificadas por ingeniería genética. En algunos casos, la composición de salida procesada resultante puede usarse en métodos para administrar a un paciente células y composiciones preparadas mediante los métodos, por ejemplo, en relación con la terapia celular adoptiva.

En determinados casos, el aislamiento o separación se realiza usando un sistema, dispositivo o aparato que realiza una o más de las etapas de aislamiento, preparación celular, separación, procesamiento, incubación, cultivo y/o formulación de los métodos. En algunos casos, el sistema se usa para realizar cada una de estas etapas en un entorno cerrado o estéril, por ejemplo, para minimizar el error, la manipulación del usuario y/o la contaminación. En un ejemplo, el sistema es un sistema como se describe en la publicación de solicitud de patente Internacional número WO2009/072003 o el documento US 20110003380 A1. En algunos casos, el sistema es un aparato o sistema cerrado, tal como se representa en la Figura 1A o la Figura 1B. En algunos casos, el sistema o aparato está automatizado y/o realiza las etapas de selección para enriquecer células de acuerdo con los métodos de forma automatizada.

En algunos casos, el sistema o aparato realiza el aislamiento, tal como etapas de selección o enriquecimiento. En algunos casos, puede usarse un sistema o aparato adicional, tal como un sistema o aparato cerrado, para realizar una o más de las otras etapas, tales como las etapas de preparación de células, procesamiento, incubación, cultivo y/o formulación del método. En algunos casos, el sistema o aparato realiza una o más, por ejemplo, la totalidad, de las etapas de aislamiento, procesamiento, ingeniería y formulación en un sistema integrado o autónomo, y/o de forma automatizada o programable. En algunos casos, el sistema o aparato incluye un ordenador y/o un programa informático en comunicación con el sistema o aparato, que permite a un usuario programar, controlar, evaluar el resultado de y/o ajustar diversos casos de las etapas de procesamiento, aislamiento, modificación por ingeniería y formulación.

En algunos casos, debido a que la composición enriquecida, como la composición de inicio de cultivo, se genera mediante los métodos divulgados para contener diferentes poblaciones celulares, tales como CD4+ y CD8+, la composición generada puede procesarse en conjunto y simultáneamente en las mismas condiciones y, en algunos

casos, en un sistema cerrado. Por lo tanto, en algunos casos, los métodos proporcionan un proceso para producir y procesar una población de células seleccionadas, enriquecidas o aisladas que contienen diferentes poblaciones de células, tales como células CD4+ y CD8+, en un único flujo de proceso. En algunos casos, esto difiere de los métodos de la técnica anterior, incluyendo métodos de la técnica anterior que procesan células para la modificación por ingeniería para terapia celular adoptiva, que normalmente incluyen un flujo de proceso separado para cada población celular diferente, tal como al menos dos flujos de proceso. Por ejemplo, en algunos casos de los métodos existentes, los linfocitos T CD4+ se aíslan, se enriquecen y/o se seleccionan por separado y se procesan en condiciones estimuladoras para la modificación por ingeniería genética, los linfocitos T CD8+ se aíslan, se enriquecen y/o se seleccionan por separado y se procesan en condiciones estimuladoras para la modificación por ingeniería genética, y los linfocitos T CD4+ y CD8+ procesados y modificados por ingeniería separados se recombinan antes de la administración a un sujeto.

En algunos casos, los métodos proporcionan una o más ventajas en comparación con otros métodos de preparación, aislamiento, incubación y modificación por ingeniería, tales como ahorro de costes, tiempo y/o recursos. Dichas ventajas pueden incluir la capacidad de aislar, procesar, por ejemplo, incubar y/o modificar por ingeniería la pluralidad de poblaciones celulares, presentes en una relación deseada o próxima a ella, con mayor eficiencia y/o menor complejidad, tiempo, coste y/o uso de recursos, en comparación con otros métodos.

En algunos casos, dichas ventajas se consiguen simplificando una o más etapas del método. Por ejemplo, en algunos casos, el aislamiento, cultivo y/o modificación por ingeniería de las diferentes poblaciones se realiza usando el mismo aparato o equipo y/o simultáneamente. En algunos casos, el aislamiento, cultivo y/o modificación por ingeniería de las diferentes poblaciones se realiza basándose en la misma composición de partida. En algunos casos, dichas características de los métodos reducen la cantidad de tiempo, etapas del método, coste, complejidad y/o número de recursos, en comparación con un método en el que las poblaciones celulares se aíslan, se incuban y/o se modifican por ingeniería por separado, en vasos separados, usando equipos separados, en momentos separados y/o comenzando con composiciones de partida diferentes.

En algunos casos, los métodos de aislamiento, incubación y modificación por ingeniería de células dan como resultado una composición de salida en la que las diferentes poblaciones celulares o tipos celulares, tales como células CD4+ y células CD8+, están presentes en una relación deseada o dentro de un determinado grado de error tolerado de la relación deseada. Dichas relaciones incluyen las que se consideran óptimas para el uso terapéutico, por ejemplo, relaciones de salida consideradas adecuadas u óptimas para la administración a un paciente en relación con la terapia celular adoptiva. También se describen métodos para administrar células y composiciones preparadas mediante los métodos a un paciente, por ejemplo, en relación con la terapia celular adoptiva.

En algunos casos, los métodos de aislamiento o selección se realizan para conseguir la selección de células en una relación de inicio de cultivo elegida de células CD4+ a células CD8+ o una subpoblación de las mismas. En algunos casos, dichas relaciones incluyen relaciones consideradas puntos de partida óptimos para conseguir una relación óptima, tal como una relación deseada en la composición de salida, al finalizar el método o una o más etapas, tal como después de una etapa de cultivo, incubación y/o modificación por ingeniería. En algunos casos, proporcionar las células en una relación de inicio de cultivo, tal como una relación de células CD4+ a células CD8+, explica las diferencias en la expansión de linfocitos T CD4+ y CD8+ que pueden producirse tras la estimulación o activación con diferentes reactivos, con el fin de conseguir una relación deseada en la composición de salida.

En algunos casos, los métodos generan células modificadas por ingeniería o células para modificación por ingeniería en o dentro de un determinado porcentaje de una relación de salida deseada, o lo hacen al menos un determinado porcentaje del tiempo. La relación de salida deseada normalmente es una relación que se ha determinado como óptima para la administración a un paciente a través de transferencia adoptiva. 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 por ejemplo 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, por ejemplo, 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 o subtipos individuales están presentes en una relación de salida deseada (tal como una relación de CD4+ a CD8+) o próxima a ella, por ejemplo, dentro de una diferencia o un error tolerados determinados de una relación 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 o subtipos individuales de células, tal como una dosis deseada de células CD4+ y/o una dosis deseada de células 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, por ejemplo, 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.

Por lo tanto, en algunos casos, la dosificación se basa en una dosis fija deseada de células totales y una relación deseada, y/o se basa en una dosis fija deseada de uno o más, por ejemplo, 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 relación deseada de células CD4⁺ a CD8⁺, y/o se basa en una dosis fija o mínima deseada de células CD4⁺ y/o CD8⁺.

- 5 En algunos casos, se divulgan métodos para determinar dichas relaciones de salida óptimas y/o dosis deseadas, y/o niveles de variación de la relación de salida deseada o la dosis deseada que se tolerarían, por ejemplo, una diferencia tolerada. En algunos casos, con el fin de conseguir la relación de salida o una o más dosis deseadas (o para conseguir una relación de este tipo un determinado porcentaje del tiempo o dentro de una determinada diferencia tolerada), las poblaciones de células se combinan o incuban en relaciones (por ejemplo, relaciones de inicio de cultivo) diseñadas para conseguir la relación de salida deseada para transferencia adoptiva.

- 10 También se divulgan métodos para determinar una relación de inicio de cultivo diseñada para conseguir la relación de salida o la dosis deseadas para hacerlo dentro de una determinada diferencia tolerada y/o un determinado porcentaje del tiempo. También se divulgan métodos para evaluar relaciones o números provisionales de las poblaciones celulares, tal como en uno o más períodos de tiempo a lo largo del curso de las diversas etapas del método, por ejemplo, durante la incubación. También se divulgan métodos para ajustar diversas condiciones, tales como las condiciones de cultivo, basándose en dichas evaluaciones. En algunos casos, los ajustes se realizan para garantizar que se consiga una determinada relación de salida o dosis o que se consiga dentro de una diferencia tolerada.

- 20 En casos particulares, se divulgan métodos simplificados para preparar una composición que tiene una relación de salida deseada, o próxima a ella, de una población de linfocitos T CD4⁺ y una población de linfocitos T CD8⁺ (por ejemplo, una población CD8⁺ enriquecida en un subtipo de linfocitos T tales como los linfocitos T de memoria central) y/o una dosis deseada (por ejemplo, número o número por unidad de peso corporal) de linfocitos T y/o de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, para la introducción de un receptor de antígenos modificado por ingeniería genética para su uso en terapia celular adoptiva, donde las poblaciones celulares se aíslan, se incuban y/o se modifican por ingeniería en combinación y el método se asocia a una eficiencia aumentada y/o una complejidad, un tiempo, un coste y/o un uso de recursos reducidos en comparación con un método en el que las poblaciones se aíslan, se incuban y/o se modifican por ingeniería por separado.

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

35 **A. Aislamiento, células aisladas y otras etapas de procesamiento**

- Entre los casos divulgados existen métodos para aislar una pluralidad de células y poblaciones de células de una muestra, así como células aisladas, tal como enriquecidas, producidas mediante dichos métodos. El aislamiento puede incluir una o más de diversas etapas de preparación y separación de células, incluyendo la separación basada en una o más propiedades, tales como el tamaño, la densidad, la sensibilidad o la resistencia a reactivos particulares y/o la afinidad, por ejemplo, inmunofluorescencia, anticuerpos u otros compañeros de unión. En algunos casos, el aislamiento se realiza usando el mismo aparato o equipo secuencialmente en un único flujo de proceso y/o simultáneamente. En algunos casos, el aislamiento, cultivo y/o modificación por ingeniería de las diferentes poblaciones se realiza a partir de la misma composición o material de partida, tal como a partir de la misma muestra.

- 45 En algunos casos, la pluralidad de poblaciones celulares están aisladas en el mismo sistema o aparato cerrado, y/o en el mismo vaso o conjunto de vasos, por ejemplo, misma unidad, cámara, columna, por ejemplo, columna de separación magnética, tubo, conjunto de tuberías, cámara de cultivo, vaso de cultivo, unidad de procesamiento, vaso de separación de células, cámara de centrifugación (o mismo conjunto de ellos). Por ejemplo, en algunos casos, el aislamiento de una pluralidad de poblaciones celulares se realiza mediante un sistema o aparato que emplea un único o el mismo vaso o conjunto de vasos de aislamiento o separación, tal como una única columna o un conjunto de columnas, y/o el mismo tubo o conjunto de tuberías, por ejemplo, sin necesidad de transferencia de la población celular, composición o suspensión de un vaso, por ejemplo, conjunto de tuberías, a otro.

- 55 En algunos casos, dichos métodos se consiguen mediante un único flujo de proceso, tal como en un sistema cerrado, empleando de selecciones simultáneas o secuenciales en las que se selecciona, enriquece y/o aísla una pluralidad de poblaciones celulares diferentes, tales como linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺, a partir de una muestra, tal como una muestra que contiene linfocitos T humanos primarios. En un caso, una muestra que contiene células se somete a una selección mediante enriquecimiento simultáneo de ambas poblaciones de CD4⁺ y CD8⁺. En algunos casos, la realización de la separación o aislamiento en el mismo vaso o conjunto de vasos, por ejemplo, conjunto de tuberías, se consigue realizando etapas de selección positiva y negativa secuenciales, sometiendo la etapa posterior a la fracción negativa y/o positiva de la etapa anterior a una selección adicional, donde todo el proceso se realiza en el mismo tubo o conjunto de tuberías. En un caso, una muestra que contiene células que han de seleccionarse se somete a una selección secuencial en la que se efectúa una primera selección para enriquecer en una de las poblaciones de CD4⁺ o CD8⁺, y las células sin seleccionar de la primera selección se usan como fuente de células para una segunda selección para enriquecer en la otra de las poblaciones de CD4⁺ o CD8⁺. En algunos casos, puede efectuarse una o

más selecciones adicionales para enriquecer en subpoblaciones de una o ambas poblaciones de CD4+ o CD8+, por ejemplo, linfocitos T de memoria central (T_{CM}).

En un caso particular, se realiza una primera etapa de selección usando perlas marcadas con moléculas de unión a CD4, tales como anticuerpos (o reactivos secundarios que reconocen dichas moléculas) y se conservan las fracciones positivas y negativas de la primera etapa de selección, seguido de una selección positiva o negativa adicional de la fracción negativa para enriquecer en células CD8+, tal como mediante el uso de perlas marcadas con moléculas de unión a CD8 y, opcionalmente, la selección de una subpoblación celular de la fracción de CD8+, tales como linfocitos T CD8+ de memoria central y/o células que expresan uno o más marcadores CD62L, CD45RA, CD45RO, CCR7, CD27, CD127 o CD44. En algunos casos, el orden de las selecciones puede invertirse. En algunos casos, siempre se realiza en primer lugar una selección de CD4 y, a partir de la fracción negativa (CD4-), la fracción de CD8+ se enriquece en una segunda selección, por ejemplo, mediante selección negativa para uno o más de CD45RA+ y CD14, y/o selección positiva para uno o más de CD62L, CCR7 y/u otros marcadores expresados en células de memoria central.

En algunos casos, una pluralidad de poblaciones celulares, por ejemplo, una población de linfocitos T CD4+ y una población de linfocitos T CD8+, se aísla, por ejemplo, para producir una composición de inicio de cultivo que contenga la pluralidad de poblaciones celulares. La composición de inicio de cultivo normalmente contiene las células en una relación de inicio de cultivo, que se diseña para producir una relación de salida deseada particular de dos o más tipos celulares, tal como una relación de CD4+ a CD8+ particular, después de una o más etapas de incubación, cultivo y/o modificación por ingeniería. La relación de salida deseada en algunos casos es una relación diseñada para que sea óptima para la administración de las células a un paciente, por ejemplo, en terapia celular adoptiva.

En algunos casos, aislar la pluralidad de poblaciones en un único vaso o en el mismo vaso o conjunto de vasos de aislamiento o separación, tal como una única columna o un conjunto de columnas, y/o el mismo tubo o conjunto de tuberías o usando la misma matriz o medios o reactivos de separación, tales como la misma matriz magnética, soporte sólido marcado por afinidad o anticuerpos u otros compañeros de unión, incluye características que simplifican el aislamiento, por ejemplo, dando como resultado una reducción de costes, tiempo, complejidad, necesidad de manipulación de muestras, uso de recursos, reactivos o equipos. En algunos casos, dichas características son ventajosas porque minimizan los costes, la eficiencia, el tiempo y/o la complejidad asociados a los métodos, y/o evitan daños potenciales al producto celular, tal como el daño provocado por la infección, contaminación y/o cambios de temperatura.

En algunos casos, las poblaciones de células aisladas obtenidas para su uso en los métodos del presente documento son estériles. La contaminación microbiana de los productos de separación de células puede, en algunos casos, conducir a la infección del sujeto receptor, tal como un paciente receptor inmunodeprimido incapaz de combatir la infección. En algunos casos, las células, las poblaciones celulares y las composiciones se producen en condiciones GMP (buenas prácticas de fabricación, por sus siglas en inglés). En algunos casos, las condiciones GMP comprenden estrictos ensayos de lotes. En determinados casos, se realiza tipificación de tejidos antes del trasplante, por ejemplo, para evitar la falta de coincidencia del antígeno leucocitario humano (HLA) y evitar problemas tales como la enfermedad de injerto contra hospedador. En algunos casos, los métodos divulgados reducen la manipulación por usuarios individuales y automatizan diversas etapas, lo que en algunos casos puede aumentar la uniformidad de las poblaciones y composiciones de células aisladas y reducir los errores, promoviendo de este modo la uniformidad y seguridad de la terapia.

1. Células y poblaciones de células

En algunos casos, los métodos incluyen realizar una selección, aislamiento y/o enriquecimiento de una muestra de células, tal como una muestra de células humanas primarias. Las poblaciones de células aisladas normalmente incluyen una pluralidad de poblaciones celulares, generalmente poblaciones de células sanguíneas o derivadas de la sangre, tales como células hematopoyéticas, leucocitos (glóbulos blancos), células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y/o células del sistema inmunitario, por ejemplo, células de la inmunidad innata o adaptativa, tales como células mieloides o linfoides, por ejemplo, linfocitos, normalmente linfocitos T y/o linfocitos NK. En algunos casos, la muestra es una muestra de aféresis o leucocitaféresis. En algunos casos, la selección, aislamiento y/o enriquecimiento pueden incluir la selección positiva o negativa de células de la muestra.

En algunos casos, la muestra es una muestra que contiene linfocitos T humanos primarios, tales como linfocitos T CD4+ y CD8+. En casos particulares, la muestra es una en la que se aísla una pluralidad de poblaciones de linfocitos T, tal como una población de células CD4+ y una población de linfocitos T CD8+. Por lo tanto, en algunos casos, el aislamiento incluye la selección positiva de células que expresan CD4 o células que expresan CD8 y/o la selección negativa de células que expresan marcadores de células no T, tales como marcadores mieloides o de linfocitos B, por ejemplo, selección negativa para células que expresan CD14, CD19, CD56, CD20, CD11b y/o CD16.

En algunos casos, la muestra es una que contiene una pluralidad de poblaciones que incluye una población de linfocitos T, tal como una población completa de linfocitos T o CD4+ y una población de linfocitos NK. Entre las poblaciones de linfocitos T que pueden enriquecerse, aislarse y/o seleccionarse se encuentran poblaciones de linfocitos T no fraccionados, células CD4+ no fraccionadas, células CD8+ no fraccionadas y subpoblaciones de

linfocitos T CD4⁺ y/o CD8⁺, incluyendo subpoblaciones de linfocitos T generadas por enriquecimiento o empobrecimiento en células de un subtipo particular o basándose en un perfil de expresión de marcadores de superficie particular.

Por ejemplo, entre los subtipos de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺) que pueden enriquecerse, aislarse y/o seleccionarse se encuentran los definidos por función, estado de activación, madurez, potencial de diferenciación, expansión, recirculación, ubicación y/o capacidades de persistencia, especificidad de antígeno, tipo de receptor de antígeno, presencia en un órgano o compartimento particular, perfil de marcadores o secreción de citocinas y/o grado de diferenciación.

Entre los subtipos y subpoblaciones de linfocitos T y/o de linfocitos T CD4⁺ y/o de linfocitos T CD8⁺ que pueden enriquecerse, aislarse y/o seleccionarse se encuentran los linfocitos T sin activación previa (TN, por sus siglas en inglés), los linfocitos T efectores (TEFF, por sus siglas en inglés), los linfocitos T de memoria y los subtipos de los mismos, tales como linfocitos T de memoria de células madre (TSCM, por sus siglas en inglés), T de memoria central (TCM, por sus siglas en inglés), T de memoria efectores (TEM, por sus siglas en inglés) o T de memoria efectores diferenciados terminalmente, linfocitos infiltrantes de tumores (TIL, por sus siglas en inglés), linfocitos T inmaduros, linfocitos T maduros, linfocitos T auxiliares, linfocitos T citotóxicos, linfocitos T invariantes asociados a mucosas (MAIT, por sus siglas en inglés), linfocitos T reguladores (Treg) adaptativos y de origen natural, linfocitos T auxiliares, tales como linfocitos TH1, linfocitos TH2, linfocitos TH3, linfocitos TH17, linfocitos TH9, linfocitos TH22, linfocitos T auxiliares foliculares, linfocitos T alfa/beta y linfocitos T delta/gamma.

En algunos casos, una o más de las poblaciones de linfocitos T enriquecidas, aisladas y/o seleccionadas de una muestra mediante los métodos divulgados son células que son positivas para (marcador⁺) o expresan niveles altos (marcadoralto) de uno o más marcadores particulares, tales como marcadores de superficie, o que son negativas para (marcador⁻) o expresan niveles relativamente bajos (marcadorbajo) de uno o más marcadores. En algunos casos, dichos marcadores son los que están ausentes o se expresan a niveles relativamente bajos en determinadas poblaciones de linfocitos T (tales como las células no de memoria) pero están presentes o se expresan a niveles relativamente más altos en otras poblaciones determinadas de linfocitos T (tales como las células de memoria). En un caso, las células (tales como las células CD8⁺ o los linfocitos T, por ejemplo, células CD3⁺) se enriquecen en (es decir, se seleccionan positivamente para) células que son positivas o que expresan altos niveles en superficie de CD45RO, CCR7, CD28, CD27, CD44, CD127 y/o CD62L y/o células empobrecidas (por ejemplo, seleccionadas negativamente) que son positivas o expresan altos niveles en superficie de CD45RA. En algunos casos, las células se enriquecen o se empobrecen en células positivas o que expresan altos niveles en superficie de CD122, CD95, CD25, CD27 y/o IL7-R α (CD127). En algunos ejemplos, los linfocitos T CD8⁺ se enriquecen en células positivas para CD45RO (o negativas para CD45RA) y en CD62L.

En algunos casos, una población de linfocitos T CD4⁺ y una subpoblación de linfocitos T CD8⁺, por ejemplo, una subpoblación enriquecida en células de memoria central (TCM, por sus siglas en inglés).

En algunos casos, las células son linfocitos citolíticos naturales (NK). En algunos casos, las células son monocitos o granulocitos, por ejemplo, células mieloides, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, mastocitos, eosinófilos y/o basófilos.

2. Muestras

Las células y las poblaciones celulares normalmente se aíslan de una muestra, tal como una muestra biológica, por ejemplo, una obtenida o derivada 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 terapéutica particular, tal como la terapia celular adoptiva para la que se aíslan, se procesan y/o se modifican por ingeniería células. En consecuencia, las células en algunos casos son células primarias, por ejemplo, células humanas primarias. Las muestras incluyen tejido, fluido y otras muestras tomadas directamente del sujeto, así como muestras resultantes de una o más etapas de procesamiento, tales como separación, centrifugación, modificación por ingeniería genética (por ejemplo, transducción con vector vírico), lavado y/o incubación. La muestra biológica puede ser una muestra obtenida directamente de una fuente biológica o una muestra que se procesa. Las muestras biológicas incluyen, pero sin limitación, fluidos corporales, tales como sangre, plasma, suero, fluido cefalorraquídeo, fluido sinovial, orina y sudor, muestras de tejidos y órganos, incluyendo muestras procesadas derivadas de las mismas.

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 (PBMC), leucocitos, médula ósea, timo, biopsia de tejido, tumor, leucemia, linfoma, ganglio linfático, tejido linfoide asociado al intestino, tejido linfoide 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, por ejemplo, terapia celular adoptiva, muestras de fuentes autólogas y alogénas.

En algunos casos, las células se obtienen de estirpes celulares, por ejemplo, estirpes de linfocitos T. En algunos casos, las células se obtienen de una fuente xenógena, por ejemplo, de ratón, rata, primate no humano y cerdo.

3. Proceso, preparación y separación no basada en afinidad de células

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 basándose en una o más propiedades, tales como densidad, propiedades adherentes, tamaño, sensibilidad y/o resistencia a componentes particulares.

En algunos ejemplos, se obtienen células de la sangre circulante de un sujeto, por ejemplo, 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.

En algunos casos, las células sanguíneas recogidas del sujeto se lavan, por ejemplo, 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, por sus siglas en inglés). 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 realiza 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, por sus siglas en inglés) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En algunos casos, las células se resuspenden en una diversidad de tampones biocompatibles después del lavado, tales 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 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.

4. Separación basada en afinidad y/o perfil de marcadores

En algunos casos, los métodos de aislamiento incluyen la separación de tipos celulares diferentes basándose en la expresión o presencia en la célula de una o más moléculas específicas, tales como marcadores de superficie, por ejemplo, proteínas de superficie, marcadores intracelulares o ácido nucleico. En algunos casos, puede usarse cualquier método conocido para la separación basado en dichos marcadores. En algunos casos, la separación es una separación basada en afinidad o inmunoafinidad. Por ejemplo, en algunos casos, el aislamiento incluye 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 las células que no se han unido al anticuerpo o al compañero de unión.

Dichas etapas de separación pueden basarse en una selección positiva, en la que se conservan las células que se han unido a los reactivos para su uso posterior, y/o una selección negativa, en la que se conservan las células que no se han unido al anticuerpo o al compañero de unión. 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.

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 refieren a aumentar el número o porcentaje de dichas células, pero no necesariamente a dar como resultado una ausencia total de células que no expresan el marcador. Análogamente, la selección negativa, la eliminación o el empobrecimiento en 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 a dar como resultado la eliminación total de todas dichas células. Por ejemplo, en algunos casos, una selección de una de entre la población CD4^{+} o CD8^{+} enriquece en dicha población, ya sea la población CD4^{+} o CD8^{+} , pero también puede contener algún porcentaje residual o pequeño de otras células sin seleccionar, que pueden, en algunos casos, incluir la otra de entre la población CD4 o CD8 que aún esté presente en la población enriquecida.

En algunos ejemplos, se realizan 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 única etapa de separación puede empobrecer en células que expresan múltiples marcadores simultáneamente, 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.

Por ejemplo, en algunos casos, se aíslan mediante técnicas de selección positiva o negativa subpoblaciones específicas de linfocitos T, tales como células positivas para, o que expresan niveles altos de, uno o más marcadores de superficie, por ejemplo, linfocitos T CD28⁺, CD62L⁺, CCR7⁺, CD27⁺, CD127⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺ y/o CD45RO⁺.

Por ejemplo, los linfocitos T CD3⁺, CD28⁺ pueden seleccionarse positivamente usando perlas magnéticas conjugadas CD3/CD28 (por ejemplo, DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T Cell Expander).

En algunos casos, el aislamiento se realiza mediante el enriquecimiento en una población celular particular mediante selección positiva, o el empobrecimiento en una población celular particular, mediante 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^{alto}) a un nivel relativamente más alto (marcador^{alto}) en las células seleccionadas positiva o negativamente, respectivamente.

En algunos casos, los linfocitos T se separan de una muestra de PBMC mediante la selección negativa de marcadores expresados en células no T, tales como linfocitos B, monocitos u otros glóbulos blancos, tales como CD14. En algunos casos, los métodos incluyen el aislamiento, selección y/o enriquecimiento de células CD4⁺ y CD8⁺. En un ejemplo, para el enriquecimiento en células CD4⁺ mediante selección negativa, un cóctel de anticuerpos monoclonales normalmente incluye anticuerpos contra CD14, CD20, CD11b, CD16 y HLA-DR. En un ejemplo, el enriquecimiento en una población CD8⁺ mediante selección negativa se realiza mediante el empobrecimiento en células que expresan CD14 y/o CD45RA. En algunos casos, se usa una etapa de selección de CD4⁺ o CD8⁺, tal como la selección positiva para CD4 y la selección positiva para CD8, para separar linfocitos CD4⁺ auxiliares y CD8⁺ citotóxicos. En algunos casos, dichas selecciones se realizan simultáneamente y en otros casos se realizan secuencialmente, en cualquier orden.

En algunos casos, los métodos incluyen una primera selección positiva de células CD4⁺ en la que las células sin seleccionar (células CD4⁻) de la primera selección se usan como fuente de células para una segunda selección positiva para enriquecer en células CD8⁺. En algunos casos, los métodos incluyen una primera selección positiva de células CD8⁺ en la que las células sin seleccionar (células CD8⁻) de la primera selección se usan como fuente de células para una segunda selección positiva para enriquecer en células CD4⁺. Dichas poblaciones de CD4⁺ y CD8⁺ pueden clasificarse adicionalmente en subpoblaciones mediante la selección positiva o negativa de marcadores expresados o expresados en un grado relativamente mayor en una o más subpoblaciones de linfocitos T sin activación previa, de memoria y/o efectores.

En algunos casos, las células CD4⁺ se enriquecen o se empobrecen adicionalmente en células madre de memoria central, sin activación previa, de memoria central y/o de memoria efectoras tal como mediante selección positiva o negativa basándose en antígenos de superficie asociados a la población respectiva. Los linfocitos T CD4⁺ auxiliares se clasifican en linfocitos sin activación previa, de memoria central y efectores mediante la identificación de poblaciones celulares que tienen antígenos de superficie celular. Pueden obtenerse linfocitos CD4⁺ mediante métodos convencionales. En algunos casos, los linfocitos T CD4⁺ sin activación previa son linfocitos T CD45RO⁻, CD45RA⁺, CD62L⁺, CD4⁺. En algunos casos, las células CD4⁺ de memoria central pueden ser CD62L⁺ y CD45RO⁺. En algunos casos, las células CD4⁺ efectoras son CD62L⁻ y CD45RO⁺.

En algunos casos, las células CD8⁺ se enriquecen o se empobrecen adicionalmente en células madre de memoria central, sin activación previa, de memoria central y/o de memoria efectoras, 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 (T_{CM}) 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 T_{CM} potencia adicionalmente su eficacia.

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

En algunos casos, el enriquecimiento en linfocitos T de memoria central (T_{CM}) se basa en una expresión en superficie alta o positiva de CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD27 y/o CD 127; en algunos casos, se basa en la selección negativa de células que expresan o expresan mucho CD45RA y/o granzima B.

En algunos casos, los métodos divulgados incluyen el aislamiento, la selección y/o el enriquecimiento de células CD8+ de una muestra, tal como mediante selección positiva basada en la expresión en superficie de CD8. En algunos casos, los métodos pueden incluir además el enriquecimiento en linfocitos T de memoria central (T_{CM}). En un caso, las células CD8+ enriquecidas pueden enriquecerse adicionalmente en linfocitos T de memoria central (T_{CM}) seleccionando uno o más marcadores expresados en linfocitos T de memoria central (T_{CM}), tales como uno o más de CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD27 y/o CD 127. La selección puede realizarse antes o después del aislamiento, selección y/o enriquecimiento de células CD4+. En algunos casos, dichas selecciones se realizan simultáneamente y en otros casos se realizan secuencialmente, en cualquier orden.

En algunos casos, los métodos incluyen una primera selección positiva de células CD4+ en la que las células sin seleccionar (células CD4-) de la primera selección se usan como fuente de células para una segunda selección para enriquecer en células CD8+, y las células CD8+ enriquecidas o seleccionadas se usan en una tercera selección para enriquecer adicionalmente en células que expresan uno o más marcadores expresados en linfocitos T de memoria central (T_{CM}), tal como mediante una tercera selección para enriquecer en células CD45RO+, CD62L+, CCR7+, CD28+, CD3+, CD27+ y/o CD127+. En algunos casos, los métodos incluyen una primera selección positiva de células CD8+ en la que las células sin seleccionar (células CD8-) de la primera selección se usan como fuente de células para la segunda selección para enriquecer en células CD4+, y las células CD8+ enriquecidas o seleccionadas de la primera selección también se usan en una tercera selección para enriquecer adicionalmente en células que expresan uno o más marcadores expresados en linfocitos T de memoria central (T_{CM}), tal como mediante una tercera selección para enriquecer en células CD45RO+, CD62L+, CCR7+, CD28+, CD3+, CD27+ y/o CD127+.

En algunos casos, el aislamiento de una población CD8+ enriquecida en linfocitos T_{CM} se realiza mediante el empobrecimiento de las células que expresan CD4, CD14, CD45RA y la selección positiva o el enriquecimiento en células que expresan CD62L. En un caso, el enriquecimiento en linfocitos T de memoria central (T_{CM}) se realiza a partir de una fracción negativa de células seleccionadas basándose en 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 células CD8+, también se usa para generar la población o subpoblación de células 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 un ejemplo particular, una muestra de PBMC u otra muestra de glóbulos blancos se somete a selección de células 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 linfocitos T de memoria central, tal como CD62L o CCR7, donde las selecciones positivas y negativas se realizan en cualquier orden.

En algunos casos, los métodos de aislamiento, selección y/o enriquecimiento en células, tal como mediante selección positiva o negativa basada en la expresión de un marcador o marcadores de superficie celular, por ejemplo, mediante cualquiera de los métodos descritos anteriormente, pueden incluir selecciones basadas en inmunoafinidad. En algunos casos, las selecciones basadas en inmunoafinidad incluyen poner en contacto una muestra que contiene células, tales como los linfocitos T humanos primarios que contienen células CD4+ y CD8+, con un anticuerpo o compañero de unión que se une específicamente al marcador o marcadores de superficie celular. En algunos casos, el anticuerpo o compañero de unión está unido a un soporte sólido o matriz, tal como una esfera o perla, por ejemplo, microperlas, nanoperlas, incluyendo agarosa, perlas magnéticas o perlas paramagnéticas, para permitir la separación de células para la selección positiva y/o negativa. En algunos casos, las esferas o perlas pueden empaquetarse en una columna para realizar la cromatografía de inmunoafinidad, en la que una muestra que contiene células, tales como los linfocitos T humanos primarios que contienen células CD4+ y CD8+, se pone en contacto con la matriz de la columna y posteriormente se eluye o se libera de la misma.

a. Perlas de inmunoafinidad

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*, págs. 17-25 Editado por: S. A. Brooks y U. Schumacher © Humana Press Inc., Totowa, NJ).

En algunos casos, la muestra o composición de células que ha de separarse se incuba con material pequeño, magnetizable o magnéticamente sensible, tal como partículas o micropartículas magnéticamente sensibles, tales como perlas paramagnéticas. El material magnéticamente sensible, por ejemplo, partícula, generalmente está unido directa o indirectamente a un compañero de unión, por ejemplo, un anticuerpo, que se une específicamente a una molécula, por ejemplo, un marcador de superficie, presente en la célula, células o población de células que se desea separar, por ejemplo, que se desea seleccionar negativa o positivamente. Dichas perlas se conocen y se comercializan en una diversidad de fuentes que incluyen, en algunos casos, Dynabeads® (Life Technologies, Carlsbad, CA), perlas MACS®

(Miltenyi Biotec, San Diego, CA) o reactivos de perlas Streptamer® (IBA, Alemania).

En algunos casos, la partícula o perla magnética comprende un material magnéticamente sensible unido a un compañero de unión específico, tal como usando un anticuerpo u otro compañero de unión. Existen muchos materiales magnéticamente sensibles bien conocidos que se usan en métodos de separación magnética. Las partículas magnéticas adecuadas incluyen las descritas en Molday, Patente de los EE. UU. N.º 4.452.773 y en la Memoria descriptiva de patente europea EP 452342 B. Las partículas de tamaño coloidal, tales como las descritas en la patente de los EE. UU. N.º 4.795.698 de Owen y Liberti *et al.*, Patente de los EE. UU. 5.200.084 son otros ejemplos.

La incubación generalmente se realiza en condiciones por 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 compañeros de unión, que están unidos a la partícula o perla magnética, se unen específicamente a moléculas de superficie celular si están presentes en las células dentro de la muestra.

En algunos casos, la muestra se coloca en un campo magnético, y las 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 conservan las células que son atraídas por el imán; para la selección negativa, se conservan 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 conservan las fracciones positivas y negativas y se procesan adicionalmente o se someten a etapas de separación adicionales.

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 junto con anticuerpos primarios o secundarios biotinilados.

En algunos casos, las partículas magnéticamente sensibles se dejan unidas a las células que posteriormente se incubarán, se cultivarán y/o se modificarán por ingeniería; 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, por ejemplo, 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, la selección basada en afinidad es a través de clasificación de células activadas magnéticamente (MACS, por sus siglas en inglés) (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Los sistemas de clasificación de células activadas magnéticamente (MACS) son capaces de realizar una selección de alta pureza de células que tienen partículas magnetizadas unidas a las mismas. En determinados casos, los MACS funcionan en un modo en donde las especies diana y no diana se eluyen secuencialmente 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 adheridas. Entonces, 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, la selección basada en afinidad emplea Streptamers®, que son perlas magnéticas, tales como nanoperlas o microperlas, por ejemplo 1-2 µM que, en algunos casos, se conjugan con un reactivo de inunoafinidad de compañero de unión, tal como un anticuerpo a través de un mutante de estreptavidina, por ejemplo, Strep-Tactin® o Strep-Tactin XT® (véase, por ejemplo, la Patente de los EE. UU. N.º 6.103.493, Solicitudes PCT publicadas internacionales N.º WO/2013011011 y WO 2014/076277). En algunos casos, el mutante de estreptavidina está funcionalizado, recubierto y/o inmovilizado en la perla.

En algunos casos, el mutante de estreptavidina presenta una mayor afinidad de unión por un ligando peptídico que contiene la secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6, tal como, por ejemplo, la SEQ ID NO: 5 y/o la SEQ ID NO: 6 (por ejemplo, Strep-tag II®), que una estreptavidina sin modificar o de tipo silvestre, tal como una estreptavidina sin modificar o de tipo silvestre expuesta en la SEQ ID NO: 11 o la SEQ ID NO: 14. En algunos casos, el mutante de estreptavidina presenta una afinidad de unión como una constante de afinidad para dichos péptidos que es superior a la afinidad de unión de la estreptavidina de tipo silvestre para el mismo péptido en más de 5 veces, 10 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces o más.

La muteína de estreptavidina contiene una o más diferencias de aminoácidos en comparación con una estreptavidina sin modificar, tal como una estreptavidina de tipo silvestre o un fragmento de la misma. La expresión "estreptavidina sin modificar" se refiere a un polipéptido de partida al que se le realizan una o más modificaciones. En algunos casos,

el polipéptido de partida o sin modificar puede ser un polipéptido de tipo silvestre expuesto en la SEQ ID NO: 11. En algunos casos, la estreptavidina sin modificar es un fragmento de estreptavidina de tipo silvestre, que se acorta en el extremo N y/o C. Dichas estreptavidinas mínimas incluyen cualquiera que comience en el extremo N en la región de las posiciones de aminoácidos 10 a 16 de la SEQ ID NO: 11 y termine en el extremo C en la región de las posiciones de aminoácidos 133 a 142 de la SEQ ID NO: 11. En algunos casos, la estreptavidina sin modificar tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 14. En algunos casos, la estreptavidina sin modificar, tal como se expone en la SEQ ID NO: 14, puede contener además una metionina N-terminal en una posición correspondiente a Ala13 con la numeración expuesta en la SEQ ID NO: 11. La referencia al número de restos en la estreptavidina divulgada en el presente documento es con referencia a la numeración de restos en la SEQ ID NO: 11.

La expresión "muteína de estreptavidina", "mutante de estreptavidina" o variaciones de las mismas, se refieren a una proteína estreptavidina que contiene una o más diferencias de aminoácidos en comparación con una estreptavidina sin modificar o de tipo silvestre, tal como una estreptavidina expuesta en la SEQ ID NO: 11 o la SEQ ID NO: 14. Las una o más diferencias de aminoácidos pueden ser mutaciones de aminoácidos, tales como uno o más reemplazos de aminoácidos (sustituciones), inserciones o supresiones. En algunos casos, una muteína de estreptavidina puede tener al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 diferencias de aminoácidos en comparación con una estreptavidina de tipo silvestre o sin modificar. En algunos casos, los reemplazos de aminoácidos (sustituciones) son mutaciones conservadoras o no conservadoras. La muteína de estreptavidina que contiene una o más diferencias de aminoácidos presenta una afinidad de unión como una constante de afinidad que es superior a $2,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ para el ligando peptídico (Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly; también denominado Strep-tag®, expuesto en la SEQ ID NO: 5). En algunos casos, el mutante de estreptavidina presenta una afinidad de unión como una constante de afinidad que es superior a $1,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ para el ligando peptídico (Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys; también denominado Strep-tag® II, expuesto en la SEQ ID NO: 6). En algunos casos, la afinidad de unión puede determinarse mediante métodos conocidos en la técnica, tales como cualesquiera de los que se describen a continuación.

En algunos casos, la muteína de estreptavidina contiene una mutación en uno o más restos 44, 45, 46 y/o 47. En algunos casos, el mutante de estreptavidina contiene los restos Val44-Thr45-Ala46-Arg47, tal como se expone en las muteínas de estreptavidina de ejemplo expuestas en la SEQ ID NO: 12 o la SEQ ID NO: 15. En algunos casos, la muteína de estreptavidina contiene los restos Ile44-Gly45-Ala46-Arg47, tal como se expone en las muteínas de estreptavidina de ejemplo expuestas en la SEQ ID NO: 13 o 16. En algunos casos, la muteína de estreptavidina presenta la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 12, 13, 15 o 16 o una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 12, 13, 15 o 16, y presenta una afinidad de unión que es superior a $2,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ para el ligando peptídico (Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly; también denominado Strep-tag®, expuesto en la SEQ ID NO: 5) y/o superior a $1,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ para el ligando peptídico (Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys; también denominado Strep-tag® II, expuesto en la SEQ ID NO: 6).

En algún caso, la muteína de estreptavidina es un mutante como se describe en la solicitud PCT publicada internacional N.º WO 2014/076277. En algunos casos, la muteína de estreptavidina contiene al menos dos restos cisteína en la región de las posiciones de aminoácidos 44 a 53 con referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en la SEQ ID NO: 11. En algunos casos, los restos cisteína están presentes en las posiciones 45 y 52 para crear un puente disulfuro que conecta estos aminoácidos. En un caso de este tipo, el aminoácido 44 es normalmente glicina o alanina y el aminoácido 46 es normalmente alanina o glicina y el aminoácido 47 es normalmente arginina. En algunos casos, la muteína de estreptavidina contiene al menos una mutación o diferencia de aminoácidos en la región de los restos de aminoácidos 115 a 121 con referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en la SEQ ID NO: 11. En algunos casos, la muteína de estreptavidina contiene al menos una mutación en las posiciones de aminoácidos 117, 120 y 121 y/o una supresión de los aminoácidos 118 y 119 y una sustitución de al menos la posición de aminoácido 121.

En algunos casos, una muteína de estreptavidina puede contener cualquiera de las mutaciones anteriores en cualquier combinación, siempre que la muteína de estreptavidina resultante presente una afinidad de unión superior a $2,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ para el ligando peptídico (Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly; también denominado Strep-tag®, expuesto en la SEQ ID NO: 5) y/o superior a $1,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ para el ligando peptídico (Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys; también denominado Strep-tag® II, expuesto en la SEQ ID NO: 6).

En algunos casos, la afinidad de unión de un mutante de estreptavidina por un reactivo de unión a ligando peptídico es superior a $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ o $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, pero generalmente es inferior a $1 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$, $1 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$ o $1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$.

En algunos casos, el mutante de estreptavidina también presenta unión a otros ligandos de estreptavidina, tales como, pero sin limitación, biotina, iminobiotina, ácido lipoico, destiobiotina, diaminobiotina, HABA (ácido hidroxiazobenceno-benzoico) y/o dimetil-HABA. En algunos casos, las muteínas de estreptavidina presentan una afinidad de unión por otro ligando de estreptavidina, tal como biotina o destiobiotina, que es superior a la afinidad de unión de la muteína de estreptavidina por el ligando peptídico (Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly; también denominado Strep-tag®, expuesto en la SEQ ID NO: 5) o el ligando peptídico (Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys; también denominado Strep-tag® II, expuesto en la SEQ ID NO: 6).

En algunos casos, la muteína de estreptavidina es un multímero. Los multímeros pueden generarse usando cualesquier métodos conocidos en la técnica, tal como se describe en la Solicitud de patente de los EE. UU. publicada N.º US2004/0082012. En algunos casos, los oligómeros o polímeros de muteínas pueden prepararse mediante la introducción de restos carboxilo en un polisacárido, por ejemplo, dextrano. En algunos casos, las muteínas de estreptavidina después se acoplan a través de grupos amino primarios de restos lisina internos y/o el extremo N libre a los grupos carboxilo en la cadena principal de dextrano usando la química de carbodiimida convencional en una segunda etapa. En algunos casos, la reacción de acoplamiento se realiza a una relación molar de aproximadamente 60 moles de estreptavidina mutante por mol de dextrano. En algunos casos, los oligómeros o polímeros también pueden obtenerse mediante reticulación a través de enlaces bifuncionales, tales como glutardialdehído o mediante otros métodos conocidos en la técnica.

En algunos casos, una perla de inmunoafinidad, tal como una Streptamer® u otra perla de inmunoafinidad, puede contener un anticuerpo producido o derivado de un hibridoma de la siguiente manera: OKT3 (αCD3), 13B8.2 (αCD4), OKT8 (αCD8), FRT5 (αCD25), DREG56 (αCD62L), MEM56 (αCD45RA). En algunos casos, cualquiera de los anticuerpos anteriores puede contener una o más mutaciones dentro del marco de las regiones variables de cadena pesada y ligera sin dirigirse a las regiones CDR altamente variables. Los ejemplos de dichos anticuerpos incluyen, en algunos casos, anticuerpos anti-CD4 como se describe en la Patente de los EE. UU. N.º 7.482.000 y Bes *et al.* (2003) *J. Biol. Chem.*, 278: 14265-14273. En algunos casos, un fragmento de unión a antígeno, tal como un fragmento Fab, pueden generarse a partir de dichos anticuerpos usando métodos conocidos en la técnica, tales como, en algunos casos, amplificación de secuencias hipervariables de cadenas pesadas y ligeras y clonación para permitir la combinación con secuencias que codifican un dominio constante adecuado. En algunos casos, el dominio constante es de la subclase humana IgG1/k. Dichos anticuerpos pueden fusionarse en el extremo carboxiterminal con una molécula de unión a estreptavidina peptídica, tal como se expone en la SEQ ID NO: 10. Se describen ejemplos de dichos anticuerpos en Stemmerget *et al.* (2102) *PLoS One*, 7:35798 y la Solicitud internacional PCT N.º WO2013/011011.

En algunos casos, el anticuerpo que se une específicamente a un marcador de superficie celular asociado a o recubierto con una perla u otra superficie es un anticuerpo de longitud completa o es un fragmento de unión a antígeno del mismo, incluyendo fragmentos (Fab), fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fab', fragmentos Fv, regiones de cadena pesada variable (V_H) capaces de unirse específicamente al antígeno, fragmentos de anticuerpos monocatenarios, incluyendo fragmentos variables monocatenarios (scFv) y anticuerpos de dominio único (por ejemplo, sdAb, sdFv, nanocuerpo). En algunos casos, el anticuerpo es un fragmento Fab'. En algunos casos, el anticuerpo puede ser monovalente, bivalente o multivalente. En algunos casos, el anticuerpo, tal como un Fab, es un multímero. En algunos casos, el anticuerpo, tal como un multímero de Fab, forma un complejo multivalente con el marcador de superficie celular.

En algunos casos, el anticuerpo, tal como un Fab, asociado a un Streptamer presenta una medida cinética particular de afinidad de unión (por ejemplo, constante de disociación, K_D, constante de asociación K_A, velocidad de disociación u otro parámetro cinético de afinidad de unión). Dichas mediciones pueden determinarse usando cualquier ensayo de unión conocido por un experto. En ejemplos particulares, se utiliza una tecnología de biosensor basada en afinidad como medida de afinidad de unión. Las tecnologías de biosensores de ejemplo incluyen, por ejemplo, tecnologías Biacore, ProteOn de BioRad, Reichert, GWC Technologies, formación de Imágenes por IBIS SPIR, Nómadas SensIQ, Akubio RAPid, Octeto ForteBio, IAsys, Nanofilm y otros (véase, por ejemplo, Rich *et al.* (2009) *Analytical Biochemistry*, 386:194-216). En algunos casos, la afinidad de unión se determina mediante titulación de fluorescencia o calorimetría de titulación.

En algunos casos, el anticuerpo, tal como un Fab, presenta una velocidad k_{disociación} (también denominada constante de velocidad de disociación) para la unión a un marcador de superficie celular en una célula que es superior a aproximadamente 0,5 × 10⁻⁴ s⁻¹, aproximadamente 1 × 10⁻⁴ s⁻¹, aproximadamente 2 × 10⁻⁴ s⁻¹, aproximadamente 3 × 10⁻⁴ s⁻¹, aproximadamente 4 × 10⁻⁴ s⁻¹, aproximadamente 5 × 10⁻⁴ s⁻¹, aproximadamente 1 × 10⁻³ s⁻¹, aproximadamente 1,5 × 10⁻³ s⁻¹, aproximadamente 2 × 10⁻³ s⁻¹, aproximadamente 3 × 10⁻³ s⁻¹, aproximadamente 4 × 10⁻³ s⁻¹, aproximadamente 5 × 10⁻³ s⁻¹, aproximadamente 1 × 10⁻² s⁻¹ o aproximadamente 5 × 10⁻¹ s⁻¹ o superior. La velocidad k_{disociación} particular puede determinar la velocidad a la que el reactivo de anticuerpo puede disociarse de su interacción con una célula a través de su unión a un marcador de superficie celular (véase, por ejemplo, la solicitud PCT internacional publicada N.º WO/2013011011). Por ejemplo, en algunos casos, el intervalo de k_{disociación} puede elegirse dentro de un intervalo, dependiendo, por ejemplo, de la aplicación o uso particular de una célula seleccionada o enriquecida, incluyendo factores tales como el deseo de eliminar el anticuerpo unido de la superficie celular, el tiempo de las células en cultivo o incubación, la sensibilidad de la célula y otros factores. En un caso, un anticuerpo tiene una velocidad k_{disociación}, por ejemplo, superior a 4,0 × 10⁻⁴ s⁻¹, de manera que, después de la alteración de los complejos de unión multivalentes, la mayor parte de los anticuerpos pueden eliminarse en una hora, puesto que, en algunos casos, teniendo en cuenta la semivida T_{1/2} del complejo, en 56 minutos la concentración de los complejos se reduce al 25 % de la concentración original, suponiendo que los efectos de reunión pueden despreciarse debido a una dilución suficiente). En otro caso, un anticuerpo con una velocidad k_{disociación} inferior de, por ejemplo, 1,0 × 10⁻⁴ s⁻¹, la disociación puede tardar más tiempo, por ejemplo, aproximadamente 212 minutos o aproximadamente 3 horas y media para eliminar el 75 % del anticuerpo de la superficie.

En algunos casos, el anticuerpo, tal como un Fab, presenta una constante de disociación (K_a) para la unión a un marcador de superficie celular en una célula que puede estar en el intervalo de aproximadamente 10^{-2} M a aproximadamente 10^{-8} M, o de aproximadamente 10^{-2} M a aproximadamente 10^{-9} M, o de aproximadamente 10^{-2} M a aproximadamente $0,8 \times 10^{-9}$ M, o de aproximadamente 10^{-2} M a aproximadamente $0,6 \times 10^{-9}$ M, o de aproximadamente 10^{-2} M a aproximadamente $0,4 \times 10^{-9}$ M, o de aproximadamente 10^{-2} M a aproximadamente $0,3 \times 10^{-9}$ M, o de aproximadamente 10^{-2} M a aproximadamente $0,2 \times 10^{-9}$ M, o de aproximadamente 10^{-2} M a aproximadamente $0,15 \times 10^{-9}$ M, o de aproximadamente 10^{-2} a aproximadamente 10^{-10} . En algunos casos, la constante de disociación (K_a) para la unión de un marcador de superficie celular a una célula puede estar en el intervalo de aproximadamente 10^{-7} M a aproximadamente 10^{-10} M, o de aproximadamente 10^{-7} M a aproximadamente $0,8 \times 10^{-9}$ M, o de aproximadamente 10^{-7} M a aproximadamente $0,6 \times 10^{-9}$ M, o de aproximadamente 10^{-7} M a aproximadamente $0,3 \times 10^{-9}$ M, o de $1,1 \times 10^{-7}$ M a aproximadamente 10^{-10} M, o de aproximadamente $1,1 \times 10^{-7}$ M a aproximadamente $0,15 \times 10^{-9}$ M, o de aproximadamente $1,1 \times 10^{-7}$ M a aproximadamente $0,3 \times 10^{-9}$ M, o de aproximadamente $1,1 \times 10^{-7}$ M a aproximadamente $0,6 \times 10^{-9}$ M, o de aproximadamente $1,1 \times 10^{-7}$ M a aproximadamente $0,8 \times 10^{-9}$ M.

En algunos casos, el reactivo de inmunoafinidad, tal como un anticuerpo, por ejemplo, un Fab, se une, directa o indirectamente, a un ligando peptídico, tal como un ligando peptídico capaz de unirse a un mutante de estreptavidina (véase, por ejemplo, la patente de los EE. UU. N.º 5.506.121). En algunos casos, dicho péptido contiene la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. En algunos casos, el reactivo de inmunoafinidad, tal como un anticuerpo, por ejemplo, un Fab, se une, directa o indirectamente, a un ligando peptídico que contiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6.

En algunos casos, el reactivo de inmunoafinidad, tal como un anticuerpo, por ejemplo, un Fab, se fusiona directa o indirectamente con una secuencia peptídica que contiene una disposición secuencial de al menos dos módulos de unión a estreptavidina, en donde la distancia entre los dos módulos es de al menos 0 y no superior a 50 aminoácidos, en donde un módulo de unión tiene de 3 a 8 aminoácidos y contiene al menos la secuencia His-Pro-Xaa (SEQ ID NO: 1), donde Xaa es glutamina, asparagina o metionina, y en donde el otro módulo de unión tiene la secuencia del mismo o diferente ligando peptídico de estreptavidina, tal como se expone en la SEQ ID NO: 3 (véase, por ejemplo, la Solicitud PCT internacional publicada N.º WO02/077018; Patente de los EE. UU. N.º 7.981.632). En algunos casos, el ligando peptídico fusionado, directa o indirectamente, al reactivo de inmunoafinidad, tal como un anticuerpo, por ejemplo, Fab, contiene una secuencia que tiene la fórmula expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 7 u 8. En algunos casos, el ligando peptídico tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 9, 10 o 17-19.

Como alternativa, pueden usarse otros péptidos de unión a estreptavidina conocidos en la técnica, por ejemplo, como describe Wilson *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001), 3750-3755). En algunos casos, el péptido se fusiona al extremo N y/o C de la proteína.

En algunos casos, el anticuerpo, tal como un Fab, fusionado a un ligando peptídico capaz de unirse a un mutante de estreptavidina, se pone en contacto con perlas que contienen mutante de estreptavidina para recubrir las perlas con anticuerpo. En algunos casos, las perlas recubiertas pueden usarse en métodos de enriquecimiento y selección como se describe en el presente documento poniendo en contacto dichas perlas con una muestra que contiene células que han de enriquecerse o seleccionarse.

En algunos casos, el enlace entre el compañero de unión del ligando peptídico y el reactivo de unión a muteína de estreptavidina es reversible. En algunos casos, el enlace entre el compañero de unión del ligando peptídico y el reactivo de unión a muteína de estreptavidina es alto, tal como se ha descrito anteriormente, pero es inferior a la afinidad de unión del reactivo de unión de estreptavidina para la biotina o un análogo de biotina. Por lo tanto, en algunos casos, puede añadirse biotina (vitamina H) o un análogo de biotina para competir por la unión para alterar la interacción de unión entre el reactivo de unión a muteína de estreptavidina en la perla y el compañero de unión a ligando peptídico asociado al anticuerpo unido específicamente a un marcador celular en la superficie. En algunos casos, la interacción puede revertirse en presencia de bajas concentraciones de biotina o análogo, tal como en presencia de 0,1 mM a 10 mM, de 0,5 mM a 5 mM o de 1 mM a 3 mM, tal como generalmente al menos o aproximadamente al menos 1 mM o al menos 2 mM, por ejemplo, en o aproximadamente 2,5 mM. En algunos casos, la incubación en presencia de un agente competidor, tal como una biotina o análogo de biotina, libera la perla de la célula seleccionada.

b. Cromatografía de inmunoafinidad

En algunos casos, la selección basada en afinidad emplea cromatografía de inmunoafinidad. Los métodos de cromatografía de inmunoafinidad incluyen, en algunos casos, una o más matrices de cromatografía como se describe en la Solicitud de patente publicada de los EE. UU. N.º US2015/0024411. En algunos casos, el método cromatográfico es una cromatografía de fluidos, normalmente una cromatografía de líquidos. En algunos casos, la cromatografía puede realizarse en un modo de flujo continuo en el que se aplica una muestra de fluido que contiene las células que han de aislarse, por ejemplo, mediante flujo por gravedad o mediante una bomba en un extremo de una columna que contiene la matriz cromatográfica y en la que la muestra de fluido sale de la columna por el otro extremo de la columna. Además, en algunos casos, la cromatografía puede realizarse en modo "arriba y abajo" en el que se aplica una muestra

de fluido que contiene las células que han de aislarse, por ejemplo, mediante una pipeta en un extremo de una columna que contiene la matriz cromatográfica empaquetada dentro de una punta de pipeta y en la que la muestra de fluido entra y sale de la matriz cromatográfica/punta de pipeta en el otro extremo de la columna. En algunos casos, la cromatografía también puede realizarse en un modo discontinuo, en el que el material cromatográfico (fase estacionaria) se incubaba con la muestra que contiene las células, por ejemplo, con agitación, rotación o contacto repetido y extracción de la muestra de fluido, por ejemplo, por medio de una pipeta.

En algunos casos, la matriz cromatográfica es una fase estacionaria. En algunos casos, la cromatografía es cromatografía en columna. En algunos casos, puede usarse cualquier material cromatográfico adecuado. En algunos casos, la matriz cromatográfica tiene la forma de una fase sólida o semisólida. En algunos casos, la matriz de cromatografía puede incluir una resina polimérica o un óxido metálico o un óxido metaloide. En algunos casos, la matriz cromatográfica es un material no magnético o no magnetizable. En algunos casos, la matriz cromatográfica es una sílice derivatizada o un gel reticulado, tal como en forma de un polímero natural, por ejemplo, un polisacárido. En algunos casos, la matriz cromatográfica es un gel de agarosa. Los geles de agarosa para su uso en una matriz de cromatografía son conocidos en la técnica e incluyen, en algunos casos, agarosa Superflow™ o un material de Sepharosa tal como Sepharose® Superflow™, que están disponibles en el mercado en diferentes tamaños de perlas y poros. En algunos casos, la matriz cromatográfica es una matriz de agarosa reticulada particular a la que hay unido dextrano covalentemente, tal como cualquiera conocido en la materia, por ejemplo, en algunos casos, Sephadex®, Superdex® o Sephacryl®, que están disponibles en diferentes tamaños de perlas y poros.

En algunos casos, una matriz de cromatografía está hecha de un polímero sintético, tal como poliácridamida, un gel de estireno-divinilbenceno, un copolímero de un acrilato y un diol o de una acrilamida y un diol, un copolímero de un polisacárido y agarosa, por ejemplo, un compuesto de poliácridamida/agarosa, un polisacárido y N, N'-metilenbiscarilamida, o una sílice derivatizada acoplada a un polímero sintético o natural.

En algunos casos, la matriz cromatográfica, tal como perlas de agarosa u otra matriz, tiene un tamaño de al menos o aproximadamente al menos 50 µm, 60 µm, 70 µm, 80 µm, 90 µm, 100 µm, 120 µm o 150 µm, o más. El límite de exclusión de la matriz de cromatografía de exclusión por tamaño se selecciona para que esté por debajo del ancho máximo de la célula diana en una muestra, por ejemplo, linfocitos T. En algunos casos, el volumen de la matriz es de al menos 0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml o más. En algunos casos, la matriz cromatográfica se empaqueta en una columna.

En algunos casos, la matriz cromatográfica, que es una matriz de cromatografía de inmunoafinidad, incluye un reactivo de afinidad, tal como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, tal como Fab, inmovilizado en el mismo. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, tal como un Fab, puede ser cualquiera como se ha descrito anteriormente, incluyendo, en algunos casos, anticuerpos conocidos en la técnica, anticuerpos que tienen una velocidad $K_{\text{disociación}}$ particular y/o anticuerpos que tienen una constante de disociación particular (K_a).

En algunos casos, el reactivo de afinidad, tal como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, tal como un Fab, está inmovilizado. En algunos casos, el reactivo de inmunoafinidad, tal como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, tal como un Fab, se fusiona o se une a un compañero de unión que interactúa con un reactivo de unión inmovilizado en la matriz. En algunos casos, la capacidad de unión de la matriz cromatográfica es suficiente para adsorber o es capaz de adsorber al menos 1×10^7 células/ml, 5×10^7 células/ml, 1×10^8 células/ml, 5×10^8 células/ml, 1×10^9 células/ml o más, en la que dichas células son células que expresan un marcador de superficie celular reconocido específicamente por el reactivo de afinidad, tal como el anticuerpo o Fab.

En algunos casos, la interacción entre el reactivo de unión y el compañero de unión forma un enlace reversible, de manera que la unión del anticuerpo a la matriz sea reversible. En algunos casos, la unión reversible puede estar mediada por un compañero de unión de mutante de estreptavidina y un reactivo de unión inmovilizado en la matriz que es estreptavidina, un análogo o muteína de estreptavidina, avidina o un análogo o muteína de avidina.

En algunos casos, la unión reversible del reactivo de afinidad, tal como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, tal como Fab es a través de un reactivo de unión de ligando peptídico y la interacción de la muteína de estreptavidina, como se ha descrito anteriormente con respecto a las perlas de inmunoafinidad. En los casos de la matriz cromatográfica, la matriz, tal como perlas de agarosa u otra matriz, está funcionalizada o conjugada con una muteína de estreptavidina, tal como cualquiera descrita anteriormente, por ejemplo, cualquiera expuesta en las SEQ ID NO: 12, 13, 15 o 16. En algunos casos, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, tal como un Fab, está fusionado o unido, directa o indirectamente, a un ligando peptídico capaz de unirse a un mutante de estreptavidina, tal como cualquiera descrito anteriormente. En algunos casos, el ligando peptídico es cualquiera de los descritos anteriormente, tal como un péptido que contiene la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-10 o 17-19. En algunos casos, la columna de matriz cromatográfica se pone en contacto con un reactivo de afinidad de este tipo, tal como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, tal como un Fab para inmovilizar o unir reversiblemente el reactivo de afinidad a la columna.

En algunos casos, la matriz de cromatografía de inmunoafinidad puede usarse en métodos de enriquecimiento y selección como se describe en el presente documento poniendo en contacto dicha matriz con una muestra que

contiene células que han de enriquecerse o seleccionarse. En algunos casos, las células seleccionadas se eluyen o liberan de la matriz alterando la interacción del compañero de unión/reactivo de unión. En algunos casos, la interacción entre el compañero de unión/reactivos de unión está mediada por un ligando peptídico y un mutante de estreptavidina, y la liberación de células seleccionadas puede efectuarse debido a la presencia de un enlace reversible. Por ejemplo, en algunos casos, el enlace entre el compañero de unión del ligando peptídico y el reactivo de unión a muteína de estreptavidina es alto, tal como se ha descrito anteriormente, pero es inferior a la afinidad de unión del reactivo de unión de estreptavidina para la biotina o un análogo de biotina. Por lo tanto, en algunos casos, puede añadirse biotina (vitamina H) o un análogo de biotina para competir por la unión para alterar la interacción de unión entre el reactivo de unión a muteína de estreptavidina en la matriz y el compañero de unión a ligando peptídico asociado al anticuerpo unido específicamente a un marcador celular en la superficie. En algunos casos, la interacción puede revertirse en presencia de bajas concentraciones de biotina o análogo, tal como en presencia de 0,1 mM a 10 mM, de 0,5 mM a 5 mM o de 1 mM a 3 mM, tal como generalmente al menos o aproximadamente al menos 1 mM o al menos 2 mM, por ejemplo, en o aproximadamente 2,5 mM. En algunos casos, elución en presencia de un agente competidor, tal como una biotina o análogo de biotina, libera la célula seleccionada de la matriz.

En algunos casos, la cromatografía de inmunoafinidad en los métodos divulgados se realiza usando al menos dos columnas de matriz de cromatografía que se conectan operativamente, por lo que un agente de afinidad o unión a uno de CD4 o CD8, tal como un anticuerpo, por ejemplo, un Fab, se acopla a una primera matriz cromatográfica en una primera columna de selección y un agente de afinidad o unión al otro de CD4 o CD8, tal como un anticuerpo, por ejemplo, un Fab, se acopla a una segunda matriz de cromatografía en una segunda columna de selección. En algunos casos, las al menos dos columnas de matriz de cromatografía están presentes en un sistema o aparato cerrado, tal como un sistema cerrado o un aparato que es estéril.

En algunos casos, en el presente documento también se divulga un sistema o aparato cerrado que contiene al menos dos columnas de matriz de cromatografía que se conectan operativamente, por lo que un agente de afinidad o unión a uno de CD4 o CD8, tal como un anticuerpo, por ejemplo, un Fab, se acopla a una primera matriz cromatográfica en una primera columna de selección y un agente de afinidad o unión al otro de CD4 o CD8, tal como un anticuerpo, por ejemplo, un Fab, se acopla a una segunda matriz de cromatografía en una segunda columna de selección. Se representan ejemplos de dichos sistemas y métodos en la Figura 1A y la Figura 1B, y en los Ejemplos.

En algunos casos, el sistema cerrado está automatizado. En algunos casos, los componentes asociados al sistema pueden incluir un microordenador integrado, una bomba peristáltica y diversas válvulas, tales como válvulas de pinza o llaves de paso, para controlar el flujo de fluido entre las diversas partes del sistema. El ordenador integrado en algunos casos controla todos los componentes del equipo y dirige el sistema para que realice procedimientos repetidos en una secuencia normalizada. En algunos casos, la bomba peristáltica controla el caudal en todo el conjunto de tuberías y, junto con las válvulas de pinza, garantiza el flujo controlado de tampón a través del sistema.

Con referencia a la Figura 1A y la Figura 1B, en algunos casos, la primera matriz de afinidad **3** que contiene un primer agente de afinidad o unión en una primera columna de selección **1** i) se une operativamente a la segunda matriz de afinidad **4** que contiene un segundo agente de afinidad o unión en una segunda columna de selección **2** a través de tuberías y una válvula **13** de manera que las células que han pasado a través de la primera matriz de cromatografía de afinidad y que no están unidas a un primer agente de afinidad o de unión en la misma son capaces de pasar a la segunda matriz de afinidad y ii) se acopla operativamente a un recipiente de salida, tal como un vaso de cultivo **12**, para recoger células seleccionadas de la primera matriz de afinidad que se unieron al primer agente de afinidad o de unión en la misma, tal como después de la elución y liberación de dichas células de la primera matriz de afinidad. En algunos casos, la segunda matriz de afinidad **4** que contiene un segundo agente de afinidad o unión en una segunda columna de selección **2** también se acopla operativamente al recipiente de salida, tal como un vaso de cultivo **12**, para recoger células seleccionadas de la segunda matriz de afinidad que se unieron al segundo agente de afinidad o de unión en la misma, tal como después de la elución y liberación de dichas células de la segunda matriz de afinidad. En algunos casos, la segunda columna de selección **2** se une operativamente al recipiente de salida, tal como el vaso de cultivo **12**, a través de una cámara de extracción **9** que contiene un reactivo de unión, tal como un mutante de estreptavidina, que es capaz de unirse con alta afinidad, tal como superior a 10^{10} M^{-1} , a un reactivo de elución, tal como biotina.

En algunos casos, el tamaño, por ejemplo, la longitud y/o el diámetro, de la primera columna de selección **1** y la segunda columna de selección **2** pueden ser iguales o diferentes. En algunos casos, el tamaño, por ejemplo, la longitud y/o el diámetro, de una de entre la primera columna **1** o la segunda columna **2** es superior al tamaño de la otra de las columnas al menos 1,2 veces, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 5 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces o más.

En algunos casos, la primera matriz de afinidad **3** que contiene un primer agente de afinidad o unión en una primera columna de selección **1** también se une operativamente a una tercera matriz de afinidad **17** que contiene un tercer agente de afinidad o unión en una tercera columna de selección **15** a través de tuberías y una válvula **13**, de manera que las células seleccionadas de la primera matriz de afinidad que se unieron al primer agente de afinidad o unión de la misma sean capaces de pasar a la tercera matriz de afinidad, tal como después de la elución y liberación de dichas células de la primera matriz de afinidad. En algunos casos, la primera columna de selección **1** se conecta

operativamente a la tercera columna de selección **15** a través de una cámara de extracción **9** que contiene un reactivo de unión, tal como un mutante de estreptavidina, que es capaz de unirse con alta afinidad, tal como superior a 10^{10} M^{-1} , a un reactivo de elución, tal como biotina. En algunos casos, la tercera matriz de afinidad **17** que contiene un tercer agente de afinidad o unión en una tercera columna de selección **15** también se acopla operativamente al recipiente de salida, tal como un vaso de cultivo **12**, para recoger células seleccionadas de la tercera matriz de afinidad que se han unido al tercer agente de afinidad o de unión de la misma (y que anteriormente se han unido al primer agente de afinidad o unión), tal como después de la elución y liberación de dichas células de la tercera matriz de afinidad (y anteriormente de la primera matriz de afinidad). En algunos casos, la tercera columna de selección **15** se conecta operativamente al recipiente de salida, tal como el vaso de cultivo **12**, a través de una cámara de extracción **9** que contiene un reactivo de unión, tal como un mutante de estreptavidina, que es capaz de unirse con alta afinidad, tal como superior a 10^{10} M^{-1} , a un reactivo de elución, tal como biotina.

En algunos casos, el tamaño, por ejemplo, la longitud y/o el diámetro, de la primera columna de selección **1** y la tercera columna de selección **15** pueden ser iguales o diferentes. En algunos casos, el tamaño, por ejemplo, la longitud y/o el diámetro, de una de entre la primera columna **1** o la tercera columna **15** es superior al tamaño de la otra de las columnas al menos 1,2 veces, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 5 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces o más.

En algunos casos, la primera columna de selección **1** se acopla operativamente a un depósito de almacenamiento que contiene una muestra de células **5**, tal como a través de tuberías, válvulas y una bomba **8**, con el fin de proporcionar una muestra de células en la primera columna de selección.

En algunos casos, la primera columna de selección **1** también se acopla operativamente a un depósito de lavado **6** que contiene tampón de lavado y/o un depósito de elución **7** que contiene un eluyente, tal como a través de tuberías y válvulas, con el fin de permitir el paso de un tampón de lavado o un tampón de elución, respectivamente, en la primera matriz de cromatografía en la primera columna de selección. En algunos casos, debido a la conexión operativa entre la primera y la segunda columna de selección, el tampón de lavado y/o el tampón de elución pueden pasar operativamente a la segunda columna. En algunos casos, debido a la conexión operativa entre la primera y la tercera columna de selección, el tampón de lavado y/o el tampón de elución pueden pasar operativamente a la tercera columna de selección.

En algunos casos, la segunda columna de selección **2** también se acopla operativamente a un depósito de lavado **6** que contiene tampón de lavado y/o un depósito de elución **7** que contiene un eluyente, tal como a través de tuberías y válvulas, con el fin de permitir el paso de un tampón de lavado o un tampón de elución, respectivamente, en la primera matriz de cromatografía en la primera columna de selección.

El tampón de lavado puede ser cualquier tampón fisiológico que sea compatible con las células, tal como solución salina tamponada con fosfato. En algunos casos, el tampón de lavado contiene albúmina sérica bovina, albúmina sérica humana o albúmina sérica humana recombinante, tal como a una concentración del 0,1 % al 5 % o del 0,2 % al 1 %, tal como o aproximadamente el 0,5 %. En algunos casos, el eluyente es biotina o un análogo de biotina, tal como desbiotina, por ejemplo, en una cantidad que sea de, o aproximadamente, al menos 0,5 mM, 1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 2,5 mM, 3 mM, 4 mM o 5 mM.

En algunos casos, la primera matriz de afinidad **3** en la primera columna de selección **1** se conecta operativamente a través de tuberías y válvulas a un primer depósito **18** de reactivo de afinidad (por ejemplo, depósito de Fab) que contiene el primer agente de afinidad o unión, tal como un anticuerpo, por ejemplo, un Fab, tal como para la inmovilización sobre la primera matriz de afinidad. En algunos casos, la segunda matriz de afinidad **4** en la segunda columna de selección **2** se conecta operativamente a través de tuberías y válvulas a un segundo depósito **19** de agente de afinidad o unión (por ejemplo, depósito de Fab) que contiene el primer agente de afinidad o unión, tal como un anticuerpo, por ejemplo, un Fab, tal como para la inmovilización sobre la segunda matriz de afinidad. En algunos casos, la tercera matriz de afinidad **17** en la tercera columna de selección **15** se conecta operativamente a través de tuberías y válvulas a un tercer depósito **20** de agente de afinidad o unión (por ejemplo, depósito de Fab) que contiene el tercer agente de afinidad o unión, tal como un anticuerpo, por ejemplo, un Fab, tal como para la inmovilización sobre la segunda matriz de afinidad.

En algunos casos, el primer y/o segundo reactivo de afinidad se une específicamente a CD4 o CD8, donde el primer y el segundo reactivo de afinidad no son iguales. En algunos casos, el tercer reactivo de afinidad se une específicamente a un marcador en linfocitos T sin activación previa, en reposo o de memoria central o se une específicamente a un marcador que es CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD27 y/o CD127.

5. Enriquecimientos y relaciones de composiciones generadas

En algunos casos, realizar una primera y una segunda selección usando métodos como se han descrito anteriormente enriquece a partir de una muestra una primera población de células que expresan un primer marcador de superficie celular y una segunda población de células que expresan un segundo marcador de superficie celular, respectivamente. En ejemplos particulares, la primera y/o segunda población de células enriquecidas puede ser una población celular

enriquecidas en células CD4+, y la otra de la población enriquecida de células, es decir, la otra de la primera o segunda población de células, puede ser una población enriquecida en CD8+. Como se ha descrito anteriormente, en algún caso, puede realizarse una tercera, cuarta o posterior selección para enriquecer en una subpoblación adicional de células a partir de una población de células enriquecidas anteriormente en los enriquecimientos primero, segundo o posterior, tal como una subpoblación de células CD4+ y/o una subpoblación de células CD8+.

En algunos casos, el método produce una composición enriquecida de células que contiene la primera y la segunda población de células enriquecidas, tal como una población de células enriquecidas en células CD4+ y una población de células enriquecidas en células CD8+. En algunos casos, la composición enriquecida de células se denomina una composición de inicio de cultivo y se usa en etapas de procesamiento posteriores, tales como etapas de procesamiento posteriores que implican incubación, estimulación, activación, modificación por ingeniería y/o formulación de las células enriquecidas. En algunos casos, posteriormente a las etapas de procesamiento posteriores, tales como etapas de procesamiento que implican incubación, estimulación, activación, modificación por ingeniería y/o formulación, se genera una composición de salida que, en algunos casos, puede contener células modificadas por ingeniería genética que contienen células CD4+ y células CD8+ que expresan un receptor de antígenos modificado por ingeniería genética.

En algunos casos, las composiciones enriquecidas de células son células enriquecidas de una muestra inicial como se ha descrito anteriormente, en la que el número de células en la muestra de partida es al menos superior al número deseado de células en una composición enriquecida, tal como una composición de inicio de cultivo. En algunos casos, el número de células en la muestra de partida es superior en al menos el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 500 %, 1000 %, 5000 % o más, superior al número deseado de células en la composición enriquecida. En algunos ejemplos, el número deseado de células en la población enriquecida, incluyendo células CD8+, células CD4+ enriquecidas o subpoblaciones de las mismas, es de al menos 1×10^6 células, 2×10^6 células, 4×10^6 células, 6×10^6 células, 8×10^6 células, 1×10^7 células, 2×10^7 células, 4×10^7 células, 6×10^7 células, 8×10^7 células, 1×10^8 células, 2×10^8 células, 4×10^8 células, 6×10^8 células, 8×10^8 células, 1×10^9 células o superior. En algunos casos, el número de células en la muestra de partida, es de al menos 1×10^8 células, 5×10^8 células, 1×10^9 células, 2×10^9 células, 3×10^9 células, 4×10^9 células, 5×10^9 células, 6×10^9 células, 7×10^9 células, 8×10^9 células, 9×10^9 células, 1×10^{10} células o más.

En algunos casos, el rendimiento de la primera y/o segunda población o subpoblación de la misma, en la composición enriquecida, es decir, el número de células enriquecidas en la población o subpoblación en comparación con el número de la misma población o subpoblación celular en la muestra de partida, es del 10 % al 100 %, tal como del 20 % al 80 %, del 20 % al 60 %, del 20 % al 40 %, del 40 % al 80 %, del 40 % al 60 % o del 60 %, al 80 %. En algunos casos, el rendimiento de la primera y/o segunda población de células o subpoblación de la misma es inferior al 70 %, inferior al 60 %, inferior al 50 %, inferior al 40 %, inferior al 30 % o inferior al 20 %.

En algunos casos, la pureza de la primera y/o segunda población de células o subpoblación de células de la misma en la composición enriquecida, es decir, el porcentaje de células positivas para el marcador de superficie celular seleccionado frente al total de células en la población de células enriquecidas, es de al menos el 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, y es generalmente de al menos el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más.

En algunos casos, la composición enriquecida de células, tal como una composición de inicio de cultivo, contiene una relación de células CD4+ a células CD8+ en una relación de inicio de cultivo. La relación de inicio de cultivo es la relación o el número de células en los que se incluyen dos tipos de células o poblaciones celulares aisladas en una composición de inicio de cultivo, diseñada para dar como resultado la relación o dosis de salida deseada, por ejemplo, relación o dosis para la administración a un paciente, o dentro de una tasa de error tolerada o diferencia de la misma, al finalizar la etapa de incubación y/o modificación por ingeniería u otras etapas de procesamiento y/o tras la descongelación y/o justo antes de la administración a un sujeto. En casos de los métodos divulgados en el presente documento, las selecciones primera y/o segunda o las selecciones para subpoblaciones de las mismas, pueden realizarse de manera que den como resultado una relación de inicio de cultivo elegida. A continuación y en los Ejemplos se describen ejemplos de dichos métodos.

a. Relaciones y números de inicio de cultivo

En algunos casos, la relación de inicio de cultivo de células CD4+ o subpoblaciones de las mismas a CD8+ o subpoblaciones de las mismas está entre 10:1, o aproximadamente, y 1:10, o aproximadamente, entre 5:1, o aproximadamente, y 1:5, o aproximadamente, o entre 2:1, o aproximadamente, y 1:2, o aproximadamente. En algunos casos, la relación de inicio de cultivo de células CD4+ o subpoblaciones de las mismas a células CD8+ o subpoblaciones de las mismas es de 1:1, o aproximadamente.

En algunos casos, la relación de inicio de cultivo de células CD4+ a CD8+, o subpoblaciones de las mismas, es diferente de la relación de células CD4+ a CD8+ o las subpoblaciones de las mismas en la muestra del sujeto. En algunos casos, se informa que la relación de linfocitos T CD4+ a CD8+ en una muestra de sujetos, tal como una muestra de sangre, está entre 1:1 y 14:1 células CD4+:CD8+, y generalmente está entre aproximadamente 1,5:1 y aproximadamente 2,5:1 células CD4+:CD8+. En algunos casos, la relación de linfocitos T CD4+ a CD8+ en una

muestra, tal como una muestra de sangre, es de aproximadamente 2:1 células CD4⁺:CD8⁺. En algunos casos, la relación de linfocitos T CD4⁺ a CD8⁺ en una muestra, tal como una muestra de sangre, es de aproximadamente 1:1. (Véase, por ejemplo, Amadori, A *et al.*, *Nature Med.* 1: 1279-1283, 1995; Chakravarti, A., *Nature Med.* 1: 1240-1241, 1995; Clementi, M., *et al.*, *Hum. Genet.* 105: 337-342, 1999). En algunos casos, una relación objeto es inferior a 1:1 células CD4⁺:CD8⁺. (Véase, por ejemplo, Muhonen, T. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol.* Enero de 1994; 15(1):67-73). En algunos casos, la relación de inicio de cultivo de células CD4⁺ a CD8⁺ es de al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 100 %, al menos el 125 %, al menos 150, al menos el 200 %, al menos el 300 %, al menos el 400 % o al menos el 500 % superior o inferior a la relación de células CD4⁺ a CD8⁺ en la muestra del sujeto.

En algunos casos, antes de realizar la primera y/o segunda selección, se determina la relación de linfocitos T CD4⁺ a CD8⁺ en la muestra del sujeto. Basándose en la relación particular de los linfocitos T CD4⁺ a CD8⁺ en el sujeto, que puede variar entre sujetos, el modo particular de selección puede individualizarse para el sujeto, por ejemplo, mediante el dimensionamiento de las columnas de cromatografía o la selección de la cantidad o concentración de reactivos de inmutafinidad, para conseguir la relación de inicio de cultivo deseada o elegida. El nivel relativo o la frecuencia de diversas poblaciones celulares en un sujeto puede determinarse basándose en la evaluación de la expresión en superficie de un marcador o marcadores presentes en dichas poblaciones o subpoblaciones. Pueden usarse varios métodos bien conocidos para evaluar el nivel de expresión de marcadores en superficie o proteínas, tales como la detección mediante métodos basados en afinidad, por ejemplo, métodos basados en inmutafinidad, por ejemplo, en el contexto de las proteínas de superficie celular, tal como mediante citometría de flujo.

En algunos contextos, la relación de inicio de cultivo adecuada para tipos celulares particulares puede variar dependiendo del contexto, p. ej., por ejemplo, para una enfermedad, afección o tratamiento previo particular de un sujeto del que derivan las células, y/o una especificidad antigénica particular de las células, representación relativa entre células de un tipo particular (por ejemplo, linfocitos T CD8⁺) de diversas subpoblaciones, por ejemplo, células efectoras frente a células de memoria frente a células sin activación previa, y/o una o más condiciones en las que se incubarán las células, tales como medio, agentes estimuladores, tiempo de cultivo, tampones, contenido de oxígeno, contenido de dióxido de carbono, antígeno, citocina, anticuerpos y otros componentes. Por lo tanto, es posible que un tipo celular que normalmente o en general se sabe que prolifera o se expande más rápidamente que otro no siempre tenga una propiedad de este tipo en todos los contextos. Por lo tanto, en algunos casos, la relación de inicio de cultivo se determina basándose en las capacidades conocidas de los tipos celulares en un contexto normal o típico, junto con la evaluación de los fenotipos o estados de las células o del sujeto del que derivan las células, y/o evidencia empírica.

En algunos casos, las relaciones de inicio de cultivo se basan en el conocimiento de una o más de estas características para un tipo particular de célula que se sabe o se determina que está en la concentración. En algunos casos, la relación de células CD4⁺ a CD8⁺ en la composición de inicio de cultivo es superior o inferior a 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces más o menos, respectivamente, que la relación de salida deseada de CD4⁺ a CD8⁺.

En algunos casos, por ejemplo, se sabe que en algunos contextos las células CD4⁺ proliferan o se expanden en menor grado o menos rápidamente en comparación con las células CD8⁺, cuando se incuban en ciertas condiciones estimuladoras. Véase, por ejemplo, Foulds *et al.* (2002) *J Immunol.* 168(4): 1528-1532; Caggiari *et al.* (2001) *Cytometry.* 46(4) 233-237; Hoffman, *et al.* (2002) *Transplantation.* 74(6): 836-845; y Rabenstein *et al.* (2014) *J Immunol.* Publicado en línea antes de su impresión el 17 de marzo de 2014, doi: 10.4049/jimmunol.1302725. Por lo tanto, en algunos ejemplos, la relación de células CD4⁺ a CD8⁺ en la composición de inicio de cultivo es de 10 veces o 100 veces la relación de salida deseada. Por ejemplo, si se desea una relación de salida de CD4/CD8 1:1 (o 50 %/50 %), las poblaciones CD4⁺ y CD8⁺ pueden, en un ejemplo, incluirse en la composición de inicio de cultivo en una relación de 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, 60:1, 70:1, 80:1, 90:1 o 100:1, por ejemplo, para tener en cuenta las diferencias en las velocidades de expansión durante un período de tiempo particular. Dependiendo de las diferencias en las velocidades de expansión o proliferación de una de las células CD4⁺ o CD8⁺, o subpoblaciones de las mismas, con respecto a la otra, un experto puede determinar empíricamente la relación de inicio de cultivo para conseguir una relación de salida deseada después de condiciones particulares de estimulación o activación.

La relación de inicio de cultivo no será necesariamente idéntica, ni siquiera aproximada, a la relación de salida deseada. Por ejemplo, si se desea administrar linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ modificados por ingeniería (por ejemplo, que expresan CAR) en o dentro de un determinado error de 1:1, la relación de inicio de cultivo de células CD4⁺ y CD8⁺ con frecuencia no es 1:1. En algunos casos, la relación de inicio de cultivo que da como resultado la relación de salida deseada varía dependiendo, por ejemplo, del origen de las células, de los tipos celulares que han de cultivarse, del paciente al que se le han de administrar las células, del sujeto o sujetos de los que se han aislado o derivado las células, tal como qué enfermedades o afecciones tiene dicho sujeto, de la enfermedad que ha de tratarse, de las condiciones de cultivo y de otros parámetros.

En algunos casos, la relación de inicio de cultivo se basa en la composición de cada subpoblación de células. En determinados casos, la relación de inicio de cultivo se basa en la duración de tiempo que las poblaciones de células

al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o más del 95 % del tiempo, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores. En determinados casos de los métodos, la relación de inicio de cultivo produce una relación de células CD4⁺ a CD8⁺ en la composición de salida que está dentro del 20 % de la relación de salida deseada al menos el 80 % del tiempo. En algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento,

5 *b. Relaciones de salida y dosis*

En algunos casos, el método da como resultado una composición de salida después de una o más etapas de procesamiento de la composición de inicio de cultivo, tal como la incubación, estimulación, activación, modificación por ingeniería y/o formulación de células. En algunos casos, el método se realiza para conseguir o dar como resultado una relación deseada de células CD4⁺ a CD8⁺, o subpoblaciones de las mismas, que está entre 2:1, o aproximadamente, y 1:5, o aproximadamente, entre 2:1, o aproximadamente, y 1:2, o aproximadamente, entre 1,5:1, o aproximadamente, y 1:5, o aproximadamente, entre 1,5:1, o aproximadamente, y 1:2, o aproximadamente, o entre 1:1, o aproximadamente y 1:2, o aproximadamente. En algunos casos, la relación de salida deseada de células CD4⁺ a CD8⁺ en la composición de salida es de 1:1 o aproximadamente 1:1.

En algunos casos, el método produce o genera una composición de salida, tal como una composición que contiene linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T CD8⁺ modificadas por ingeniería genética o subpoblaciones de los mismos, en los que la relación de salida de células CD4⁺ a CD8⁺ en la composición, o subpoblaciones de las mismas, está entre 2:1, o aproximadamente, y 1:5, o aproximadamente, entre 2:1, o aproximadamente, y 1:2, o aproximadamente, entre 1,5:1, o aproximadamente, y 1:5, o aproximadamente, entre 1,5:1, o aproximadamente, y 1:2, o aproximadamente, o entre 1:1, o aproximadamente, y 1:2, o aproximadamente. En algunos casos, el método produce o genera una composición de salida que contiene una relación de salida de células CD4⁺ a CD8⁺ que es 1:1 o es aproximadamente 1:1.

En algunos casos, la relación de salida de linfocitos T CD4⁺ a CD8⁺ es una relación que se desea como parte de una dosificación de linfocitos T para inmunoterapia, tal como en relación con métodos de inmunoterapia adoptiva.

En algunos casos, se determinan las dosificaciones deseadas, tales como el número de células deseado y/o las relaciones de salida deseadas de los tipos o poblaciones celulares (por ejemplo, relaciones óptimas para la administración terapéutica a un paciente). En algunos casos, los métodos incluyen etapas para determinar el error tolerado o la diferencia tolerada con respecto a una relación o dosis de salida o administración deseada, es decir, el margen de error por el que la relación en una composición dada, por ejemplo, composición modificada por ingeniería, puede variar con respecto a una relación de salida deseada y aún conseguir el resultado deseado, tal como un grado aceptable de seguridad en un sujeto o paciente, o eficacia en el tratamiento de una enfermedad o afección particular u otro efecto terapéutico.

En algunos casos, la dosis deseada, la relación y/o el error tolerado dependen de la enfermedad o afección que ha de tratarse, del sujeto, del origen de las células, tal como si las células son de un sujeto que padece una afección o enfermedad particular y si las células son para trasplante autólogo o alógeno, por ejemplo, si se aíslan de un sujeto que también ha de recibir las células en la terapia celular adoptiva y/o si el sujeto ha recibido o está recibiendo otro tratamiento y/o la identidad de dicho tratamiento. En algunos casos, la relación, el número y/o la diferencia o el error tolerados dependen de una o más de otras propiedades de las células, tales como la velocidad de proliferación, la capacidad de supervivencia, la expresión de marcadores particulares o la secreción de factores, tales como citocinas o subpoblaciones particulares aisladas antes de las etapas de incubación y modificación por ingeniería. En algunos ejemplos, la relación deseada y/o el error o diferencia tolerados pueden variar dependiendo de la edad, el sexo, la salud y/o el peso del sujeto, de los biomarcadores como indicación del rasgo de la enfermedad, de los tratamientos que han de coadministrarse o que se hayan administrado anteriormente al sujeto.

En algunos casos, la relación deseada, la dosis y/o el error tolerado se determinan administrando diversas composiciones de ensayo, conteniendo cada una los tipos o poblaciones celulares de interés en diferentes relaciones o cantidades diferentes para un sujeto de ensayo, seguido de la evaluación de uno o más resultados o parámetros, tales como un parámetro indicativo de seguridad, eficacia terapéutica, concentración *in vivo* o localización de las células, y/u otro resultado deseado.

El sujeto de ensayo en algunos casos es un animal no humano, tal como un animal normal o un modelo animal de enfermedad, tal como la enfermedad o afección que ha de tratarse mediante la administración de las células. En algunos casos, las diversas relaciones de ensayo para la administración a sujetos de ensayo son del 90 %/10 %, 80 %/20 %, 70 %/30 %, 60/40 %, 50/50 %, 40/60 %, 30/70 %, 20 %/80 % y 10 %/90 %, o aproximadamente, por ejemplo, expresadas como porcentaje de un tipo o subtipo celular (por ejemplo, linfocito T CD4⁺ o subtipo del mismo) y otro tipo celular (por ejemplo, linfocito T CD8⁺ o linfocito NK o subtipo de los mismos) y valores provisionales. Las relaciones pueden expresarse como porcentajes relativos o en cualquier otro formato, tales como relaciones de 0,1:1, 0,5:1, 0,7:1, 0,8:1, 0,9:1, 1:1, 1:1,1, 1:1,2, 1:1,3, 1:1,4, 1:1,5, o más de 1:1,5, o aproximadamente, o 1:0,1, 1:0,4, 1:0,7,

1:0,8, 1:0,8, 1,1:1, 1,2:1, 1,3:1, 1,4:1 o 1,5:1, o aproximadamente, o más, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores. En algunos casos, el sujeto de ensayo es un ser humano. En algunos casos, la relación deseada es el promedio, la media o relación mediana entre sujetos de ensayo con un efecto óptimo particular. En algunos casos, la relación deseada es una relación que consigue un equilibrio óptimo entre seguridad y eficacia. En algunos casos, la relación o dosis deseada es una relación o dosis que consigue la mayor eficacia de todas las relaciones o dosis de ensayo, manteniendo al mismo tiempo un grado umbral de seguridad. En algunos casos, la relación o dosis deseada es una relación o dosis que consigue el mayor grado de seguridad manteniendo un grado umbral de eficacia o dentro de un intervalo de eficacia. En algunos casos, la relación o dosis óptima se expresa en forma de un intervalo, tal como entre 1:1 y 1:2 de un tipo celular a otro o entre 10^4 y 10^9 o entre 10^5 y 10^6 células por kg de peso corporal.

En algunos casos, el error tolerado se determina basándose en la desviación del promedio deseado. Los sujetos de ensayo se controlan para evaluar la eficacia terapéutica y/o la seguridad de cada combinación porcentual. En algunos casos, el error tolerado estará 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 relación deseada, incluyendo cualquier valor entre estos intervalos.

6. Métodos de ejemplo de selección o enriquecimiento de células

a. Flujo de proceso único y/o selección simultánea usando perlas inmunomagnéticas

En algunos casos, la separación y/o etapas se realizan usando perlas inmunomagnéticas. En algunos casos, una muestra de células que contiene células CD4+ y CD8+, tal como una muestra primaria de linfocitos T humanos, se pone en contacto con perlas magnéticas que contienen un primer reactivo de inmunofinidad que se une a CD4 o CD8 y perlas magnéticas que contienen un segundo reactivo de inmunofinidad que se une al otro de entre CD4 o CD8. La separación y/o etapas pueden producirse simultáneamente y/o secuencialmente.

En algunos casos, el contacto de las células con las perlas magnéticas se realiza simultáneamente, por lo que el enriquecimiento de células que contienen los marcadores de superficie CD4 y CD8 también se realiza simultáneamente. En algunos de dichos casos, el método incluye poner en contacto células de una muestra que contiene linfocitos T humanos primarios con un primer reactivo de inmunofinidad que se une específicamente a CD4 y un segundo reactivo de inmunofinidad que se une específicamente a CD8 en una composición de incubación, en condiciones en las que los reactivos de inmunofinidad se unen específicamente a las moléculas CD4 y CD8, respectivamente, en la superficie de las células de la muestra, y recuperar las células unidas al primer y/o segundo reactivo de inmunofinidad, generando de este modo una composición enriquecida que incluye células CD4+ y células CD8+ en una relación de inicio de cultivo.

En algunos casos, el primer y/o el segundo reactivo de inmunofinidad están presentes en la composición de incubación en una concentración de rendimiento subóptima, en donde la composición enriquecida contiene menos del 70 % del total de células CD4+ en la composición de incubación y/o menos del 70 % de las células CD8+ en la composición de incubación, produciendo de este modo una composición enriquecida en linfocitos T CD4+ y CD8+.

En algunos casos, la concentración de rendimiento subóptima del reactivo de afinidad es una concentración inferior a una concentración utilizada o requerida para conseguir un rendimiento óptimo o máximo de células unidas en una selección o un enriquecimiento dados que implica la incubación de células con el reactivo y la recuperación o separación de células que se han unido al reactivo (siendo "rendimiento", por ejemplo, el número de células recuperadas o seleccionadas de este modo en comparación con el número total de células en la incubación que son la diana del reactivo o para las que el reactivo es específico o que tienen un marcador para el que el reactivo es específico y capaz de unirse). La concentración de rendimiento subóptima generalmente es una concentración o cantidad del reactivo que en dicho proceso o etapa no consigue más del 70 % de rendimiento de células unidas, tras la recuperación de las células que se han unido al reactivo. En algunos casos, no se consigue un rendimiento superior al 50 %, 45 %, 40 %, 30 % o 25 %, o aproximadamente, con la concentración subóptima. La concentración puede expresarse en términos de número o masa de partículas o superficies por célula y/o número de masa o moléculas de agente (por ejemplo, anticuerpo, tal como un fragmento de anticuerpo) por célula.

Por ejemplo, en algunos casos, la concentración de rendimiento subóptima es inferior a $30 \mu\text{M}$, o aproximadamente, de agente (por ejemplo, anticuerpo) por 1×10^9 , por cada 2×10^9 células, por cada 3×10^9 células, por cada 4×10^9 células, por cada 5×10^9 células, por cada 10×10^9 células, por cada 15×10^9 células o por cada 20×10^9 células en la composición de incubación. En algunos casos, la concentración de rendimiento subóptima es inferior a $30 \mu\text{M}$, o aproximadamente, de agente (por ejemplo, anticuerpo) por 1×10^9 , por cada 2×10^9 células, por cada 3×10^9 células, por cada 4×10^9 células, por cada 5×10^9 células, por cada 10×10^9 células, por cada 15×10^9 células o por cada 20×10^9 células en la composición de incubación; en algunos casos, la concentración de rendimiento subóptima es inferior a $20 \mu\text{M}$, o aproximadamente, de agente (por ejemplo, anticuerpo) por 1×10^9 , por cada 2×10^9 células, por cada 3×10^9 células, por cada 4×10^9 células, por cada 5×10^9 células, por cada 10×10^9 células, por cada 15×10^9 células o por cada 20×10^9 células en la composición de incubación; en algunos casos, la concentración de rendimiento

subóptima es inferior a 10 μM , o aproximadamente, de agente (por ejemplo, anticuerpo) por 1×10^9 , por cada 2×10^9 células, por cada 3×10^9 células, por cada 4×10^9 células, por cada 5×10^9 células, por cada 10×10^9 células, por cada 15×10^9 células o por cada 20×10^9 células en la composición de incubación; en algunos casos, la concentración de rendimiento subóptima es inferior a 15 μM , o aproximadamente, de agente (por ejemplo, anticuerpo) por 1×10^9 , por cada 2×10^9 células, por cada 3×10^9 células, por cada 4×10^9 células, por cada 5×10^9 células, por cada 10×10^9 células, por cada 15×10^9 células o por cada 20×10^9 células en la composición de incubación; en algunos casos, la concentración de rendimiento subóptima es inferior a 1 μM , o aproximadamente, de agente (por ejemplo, anticuerpo) por 1×10^9 , por cada 2×10^9 células, por cada 3×10^9 células, por cada 4×10^9 células, por cada 5×10^9 células, por cada 10×10^9 células, por cada 15×10^9 células o por cada 20×10^9 células en la composición de incubación; en algunos casos, la concentración de rendimiento subóptima es inferior a 0,5 μM , o aproximadamente, de agente (por ejemplo, anticuerpo) por 1×10^9 , por cada 2×10^9 células, por cada 3×10^9 células, por cada 4×10^9 células, por cada 5×10^9 células, por cada 10×10^9 células, por cada 15×10^9 células o por cada 20×10^9 células en la composición de incubación; en algunos casos, la concentración de rendimiento subóptima es inferior a 0,2 μM , o aproximadamente, de agente (por ejemplo, anticuerpo) por 1×10^9 , por cada 2×10^9 células, por cada 3×10^9 células, por cada 4×10^9 células, por cada 5×10^9 células, por cada 10×10^9 células, por cada 15×10^9 células o por cada 20×10^9 células en la composición de incubación.

En algunos casos, la concentración de rendimiento subóptima es inferior a 15 mg de perlas, o aproximadamente, partículas, superficie o reactivo total, por cada 1×10^9 , por cada 2×10^9 células, por cada 3×10^9 células, por cada 4×10^9 células, por cada 5×10^9 células, por cada 10×10^9 células, por cada 15×10^9 células o por cada 20×10^9 células en la composición de incubación; en algunos casos, la concentración de rendimiento subóptima es inferior a 10 mg de perlas, o aproximadamente, partículas, superficie o reactivo total, por cada 1×10^9 , por cada 2×10^9 células, por cada 3×10^9 células, por cada 4×10^9 células, por cada 5×10^9 células, por cada 10×10^9 células, por cada 15×10^9 células o por cada 20×10^9 células en la composición de incubación; en algunos casos, la concentración de rendimiento subóptima es inferior a 5 mg de perlas, o aproximadamente, partículas, superficie o reactivo total, por cada 1×10^9 , por cada 2×10^9 células, por cada 3×10^9 células, por cada 4×10^9 células, por cada 5×10^9 células, por cada 10×10^9 células, por cada 15×10^9 células o por cada 20×10^9 células en la composición de incubación; en algunos casos, la concentración de rendimiento subóptima es inferior a 4 mg de perlas, o aproximadamente, partículas, superficie o reactivo total, por cada 1×10^9 , por cada 2×10^9 células, por cada 3×10^9 células, por cada 4×10^9 células, por cada 5×10^9 células, por cada 10×10^9 células, por cada 15×10^9 células o por cada 20×10^9 células en la composición de incubación; en algunos casos, la concentración de rendimiento subóptima es inferior a 3 mg de perlas, o aproximadamente, partículas, superficie o reactivo total, por cada 1×10^9 , por cada 2×10^9 células, por cada 3×10^9 células, por cada 4×10^9 células, por cada 5×10^9 células, por cada 10×10^9 células, por cada 15×10^9 células o por cada 20×10^9 células en la composición de incubación; en algunos casos, la concentración de rendimiento subóptima es inferior a 2 mg de perlas, o aproximadamente, partículas, superficie o reactivo total, por cada 1×10^9 , por cada 2×10^9 células, por cada 3×10^9 células, por cada 4×10^9 células, por cada 5×10^9 células, por cada 10×10^9 células, por cada 15×10^9 células o por cada 20×10^9 células en la composición de incubación; en algunos casos, la concentración de rendimiento subóptima es inferior a 1 mg de perlas, o aproximadamente, partículas, superficie o reactivo total, por cada 1×10^9 , por cada 2×10^9 células, por cada 3×10^9 células, por cada 4×10^9 células, por cada 5×10^9 células, por cada 10×10^9 células, por cada 15×10^9 células o por cada 20×10^9 células en la composición de incubación; en algunos casos, la concentración de rendimiento subóptima es inferior a 0,5 mg de perlas, o aproximadamente, partículas, superficie o reactivo total, por cada 1×10^9 , por cada 2×10^9 células, por cada 3×10^9 células, por cada 4×10^9 células, por cada 5×10^9 células, por cada 10×10^9 células, por cada 15×10^9 células o por cada 20×10^9 células en la composición de incubación.

En algunos casos, por ejemplo, cuando se opera en una concentración de rendimiento subóptima para cada uno o uno o más de dos o más reactivos de selección con afinidad por dos o más marcadores o células, uno o más de dichos reactivos se usan a una concentración que es superior a la de uno o más del otro reactivo o reactivos, con el fin de sesgar la relación del tipo celular reconocido por ese reactivo en comparación con el tipo o tipos celulares reconocidos por el otro u otros. Por ejemplo, el reactivo que se une específicamente al marcador para el que se desea sesgar la relación puede incluirse a una concentración (por ejemplo, agente o masa por células) que se aumenta a la mitad, 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces o más, en comparación con el otro u otros, dependiendo de cuánto se desee aumentar la relación.

En algunos casos, el uso de una concentración de rendimiento subóptima para sesgar una o ambas poblaciones de células puede conseguir una relación de inicio de cultivo deseada o elegida. En algunos casos, la selección se realiza a partir de una muestra, que es una muestra que contiene células CD4⁺ y CD8⁺, que contienen un gran número de células, tal como al menos 1×10^9 células, 2×10^9 células, 3×10^9 células, 4×10^9 células, 5×10^9 células, 6×10^9 células, 7×10^9 células, 8×10^9 células, 1×10^{10} células, 2×10^{10} células, 3×10^{10} células, 4×10^{10} células, 5×10^{10} células o más. En algunos casos, el elevado número de células es suficiente para garantizar la saturación de los

reactivos de inmunofluorescencia en la muestra para las células que expresan un marcador, tal como CD4 o CD8, en las que el reactivo se une específicamente.

En algunos casos, cuando se opera en el intervalo subóptimo y/o con suficientes células para conseguir la saturación de reactivos, la cantidad de reactivo de inmunofluorescencia es proporcional al rendimiento aproximado de células enriquecidas. En un caso, para conseguir una relación de inicio de cultivo de aproximadamente 1:1 de células CD4+ a células CD8+, la selección de células CD4+ y células CD8+ puede realizarse con la misma, o aproximadamente la misma, concentración de rendimiento subóptimo de reactivos de inmunofluorescencia para CD4 y CD8, respectivamente. En otro caso de ejemplo, para conseguir una relación de inicio de cultivo de aproximadamente 2:1 de células CD4+ a células CD8+, la selección de células CD4+ puede realizarse con una concentración de rendimiento subóptima de un reactivo de inmunofluorescencia para CD4 que es aproximadamente dos veces mayor que la concentración de rendimiento subóptima de un reactivo de inmunofluorescencia para CD8. Está dentro del nivel de un experto seleccionar o elegir empíricamente una cantidad o concentración adecuada de reactivos de inmunofluorescencia dependiendo de la relación de inicio de cultivo deseada o elegida de la composición generada que contiene células enriquecidas o seleccionadas en vista de la ejemplificación anterior.

En algunos casos, la separación y/o las etapas se realizan usando perlas magnéticas en las que se unen reversiblemente reactivos de inmunofluorescencia, tal como a través de una interacción de ligando peptídico con una proteína de estreptavidina como se ha descrito anteriormente. Un ejemplo de este tipo de perlas magnéticas son Streptamers®. En algunos casos, la separación y/o las etapas se realizan usando perlas magnéticas, tales como las que se encuentran disponibles en el mercado en Miltenyi Biotec.

En algunos casos, la separación y/u otras etapas se realizan para la separación automatizada de células a escala clínica en un sistema cerrado y estéril. Los componentes pueden incluir un microordenador integrado, una unidad de separación magnética, una bomba peristáltica y diversas válvulas de pinza. El ordenador integrado en algunos casos controla todos los componentes del equipo y dirige el sistema para que realice procedimientos repetidos en una secuencia normalizada. La unidad de separación magnética en algunos aspectos incluye un imán permanente móvil y un soporte para la columna de selección. La bomba peristáltica controla el caudal en todo el conjunto de tuberías y, junto con las válvulas de pinza, garantiza el flujo controlado de tampón a través del sistema y la suspensión continua de células. En algunos casos, la separación y/u otras etapas se realizan usando el sistema CliniMACS (Miltenyi Biotec).

En algunos casos, la separación automatizada, tal como usando el sistema CliniMACS, en algunos casos, usa partículas magnetizables acopladas a anticuerpos que se suministran en una solución estéril y apirógena. En algunos casos, después del marcaje de las células con partículas magnéticas, las células se lavan para eliminar el exceso de partículas. Después se conecta una bolsa de preparación celular al conjunto de tuberías, que a su vez se conecta a una bolsa que contiene tampón y una bolsa de recogida de células. El conjunto de tuberías consiste en tuberías estériles ensambladas previamente, incluyendo una precolumna y una columna de separación, y son para un solo uso. Después del inicio del programa de separación, el sistema aplica automáticamente la muestra de células en la columna de separación. Las células marcadas quedan retenidas dentro de la columna, mientras que las células sin marcar se extraen mediante una serie de etapas de lavado. En algunos casos, las poblaciones de células para su uso con los métodos descritos en el presente documento están sin marcar y no quedan retenidas en la columna. En algunos casos, las poblaciones de células para su uso con los métodos descritos en el presente documento están marcadas y quedan retenidas en la columna. En algunos casos, las poblaciones de células para su uso con los métodos descritos en el presente documento se eluyen de la columna después de la eliminación del campo magnético y se recogen dentro de la bolsa de recogida de células.

En determinados casos, la separación y/u otras etapas se realizan usando un sistema equipado con una unidad de procesamiento celular que permite el lavado y el fraccionamiento automatizados de las células mediante centrifugación. En algunos casos, la separación y/u otras etapas se realizan usando el sistema CliniMACS Prodigy (Miltenyi Biotec). Un sistema con una unidad de procesamiento celular también puede incluir una cámara integrada y un programa informático de reconocimiento de imágenes que determina el punto final de fraccionamiento celular óptimo al discernir las capas macroscópicas del producto de la célula de origen. Por ejemplo, la sangre periférica se separa automáticamente en eritrocitos, glóbulos blancos y capas de plasma. Un sistema de procesamiento celular, tal como el sistema CliniMACS Prodigy, también puede incluir una cámara de cultivo celular integrada que realiza protocolos de cultivo celular tales como, por ejemplo, diferenciación y expansión celular, carga de antígeno y cultivo celular a largo plazo. Los puertos de entrada pueden permitir la extracción estéril y el reabastecimiento de los medios y las células pueden controlarse usando un microscopio integrado. Véanse, por ejemplo, Klebanoff *et al.* (2012) *J Immunother.* 35(9): 651-660, Terakura *et al.* (2012) *Blood.* 1:72-82 y Wang *et al.* (2012) *J Immunother.* 35(9):689-701.

En algunos casos, una población celular descrita en el presente documento se recoge y enriquece (o empobrece) a través de citometría de flujo, en la que las células teñidas para múltiples marcadores de superficie celular se transportan en una corriente fluida. En algunos casos, una población celular descrita en el presente documento se recoge y enriquece (o empobrece) a través de clasificación a escala preparativa (FACS). En determinados casos, una población celular descrita en el presente documento se recoge y enriquece (o empobrece) mediante el uso de chips de sistemas microelectromecánicos (MEMS, por sus siglas en inglés) en combinación con un sistema de detección basado en FACS (véase, por ejemplo, el documento WO 2010/033140, Cho *et al.* (2010) *Lab Chip* 10, 1567-1573; y

Godin *et al.* (2008) *J Biophoton.* 1(5):355-376. En ambos casos, las células pueden marcarse con múltiples marcadores, lo que permite el aislamiento de subconjuntos de linfocitos T bien definidos con alta pureza.

En algunos casos, los anticuerpos o compañeros de unión están marcados con uno o más marcadores detectables, para facilitar la separación mediante selección positiva y/o negativa. Por ejemplo, la separación puede basarse en la unión a anticuerpos marcados con fluorescencia. En algunos ejemplos, la separación de células basada en la unión de anticuerpos u otros compañeros de unión específicos para uno o más marcadores de superficie celular se realiza en una corriente fluidica, tal como mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés), incluyendo chips de escala preparativa (FACS) y/o sistemas microelectromecánicos (MEMS), por ejemplo, en combinación con un sistema de detección por citometría de flujo. Dichos métodos permiten la selección positiva y negativa basada en múltiples marcadores simultáneamente.

b. Flujo de proceso único y/o selecciones secuenciales usando cromatografía de inmutafinidad

En algunos casos, la primera selección o enriquecimiento de una población de células y la segunda selección y/o enriquecimiento de una población de células se realizan usando reactivos basados en inmutafinidad que incluyen al menos una primera y una segunda matriz de cromatografía de afinidad, respectivamente, habiendo inmutafinado sobre las mismas un anticuerpo. En algunos casos, una o ambas de la primera y/o segunda selección pueden emplear una pluralidad de matrices de cromatografía de afinidad y/o anticuerpos, por lo que la pluralidad de matrices y/o anticuerpos empleados para la misma selección, es decir, la primera selección o la segunda selección, están conectados en serie. En algunos casos, la matriz o matrices de cromatografía de afinidad empleadas en una primera y/o segunda selección adsorbe o es capaz de seleccionar o enriquecer al menos aproximadamente 50×10^6 células/ml, 100×10^6 células/ml, 200×10^6 células/ml o 400×10^6 células/ml. En algunos casos, la capacidad de adsorción puede modularse basándose en el diámetro y/o longitud de la columna. En algunos casos, la relación de inicio de cultivo de la composición seleccionada o enriquecida se consigue eligiendo una cantidad suficiente de matriz y/o una cantidad relativa suficiente para conseguir la relación de inicio de cultivo suponiendo que se basa en, por ejemplo, la capacidad de adsorción de la columna o columnas para seleccionar células.

En un caso de ejemplo, la capacidad de adsorción de la matriz o matrices es la misma entre la primera y la segunda selección, por ejemplo, es de 1×10^8 células/ml, o aproximadamente, para ambas, por lo que el enriquecimiento o selección de células en la primera selección y la segunda selección da como resultado una composición que contiene una relación de células CD4+ a células CD8+ en una relación de inicio de cultivo de 1:1, o aproximadamente. En otro caso de ejemplo, la capacidad de adsorción de la matriz o matrices utilizadas en una de entre la primera selección o la segunda selección es al menos 1,5 veces, 2,0 veces, 3,0 veces, 4,0 veces, 5,0 veces, 6,0 veces, 7,0 veces, 8,0 veces, 9,0 veces, 10,0 veces o superior a la capacidad de adsorción de la matriz o matrices utilizadas en la otra de la primera selección o segunda selección, dando como resultado una relación de inicio de cultivo en la que hay presentes células seleccionadas con la mayor capacidad de adsorción, por ejemplo, células CD4+ y/o células CD8+, en la relación de inicio de cultivo en una cantidad que es al menos 1,5 veces, 2,0 veces, 3,0 veces, 4,0 veces, 5,0 veces, 6,0 veces, 7,0 veces, 8,0 veces, 9,0 veces, 10,0 veces o más que la otra población celular. Está dentro del nivel de un experto seleccionar o elegir un volumen, diámetro o número adecuado de las columnas de cromatografía de matriz de afinidad para la primera y/o segunda selección dependiendo de la relación de inicio de cultivo deseada o elegida de la composición generada que contiene células enriquecidas o seleccionadas.

En el Ejemplo 2 se exponen procesos de ejemplo para realizar selecciones mediante los métodos divulgados. En algunos casos, dichos procesos consiguen una relación de inicio de cultivo deseada en una composición enriquecida o generada.

En algunos casos, la primera y/o segunda selección en los métodos divulgados incluye primero enriquecer en una de las células CD4+ o CD8+, y después enriquecer en una subpoblación celular basándose en, por ejemplo, la expresión superficial de un marcador expresado en linfocitos T en reposo, sin activación previa o de memoria central, por ejemplo, un marcador que es CD28, CD62L, CCR7, CD127 o CD27. En algunos casos, la primera y/o segunda selección incluye enriquecer en células CD8+, dicha selección comprende además enriquecer en linfocitos T de memoria central (T_{CM}), donde la otra de entre la primera y/o segunda selección incluye enriquecer en células CD4+. En algún caso, los métodos se realizan para enriquecer en o seleccionar células CD4+ y para enriquecer en o seleccionar una subpoblación de células que son CD8+/CD28+, CD8+/CD62L+, CD8+/CCR7+, CD8+/CD127+ o CD8+/CD27+. En algunos casos, la primera selección incluye el enriquecimiento en células CD8+ y la segunda selección incluye el enriquecimiento en células CD4+, donde la primera selección, que incluye células enriquecidas en células CD8+, incluye además enriquecer en linfocitos T de memoria central (T_{CM}) células o enriquecer en células que expresan un marcador que es CD28, CD62L, CCR7, CD127 o CD27, generando de este modo una composición, tal como una composición de inicio de cultivo, que contiene células CD4+ y CD8+ enriquecidas en linfocitos T de memoria central (T_{CM}) o una célula que expresa un marcador que es CD28, CD62L, CCR7, CD127 o CD27. En algunos casos, la primera selección incluye el enriquecimiento en células CD4+ y la segunda selección incluye el enriquecimiento en células CD8+, en donde la segunda selección, que incluye células enriquecidas en células CD8+, incluye además enriquecer en linfocitos T de memoria central (T_{CM}) células o enriquecer en células que expresan un marcador que es CD28, CD62L, CCR7, CD127 o CD27, generando de este modo una composición, tal como una composición de inicio de cultivo, que contiene células CD4+ y CD8+ enriquecidas en linfocitos T de memoria central (T_{CM}) o una célula que

expresa un marcador que es CD28, CD62L, CCR7, CD127 o CD27.

En algunos de dichos casos que implican un enriquecimiento adicional de una subpoblación de células, para conseguir la relación de inicio de cultivo de células CD4+ o una subpoblación de las mismas con respecto a células CD8+ o una subpoblación de las mismas, la capacidad de adsorción de una matriz o matrices de columna se ajusta para tener en cuenta las diferencias en la frecuencia de una subpoblación, es decir, células CD4+ o CD8+ enriquecidas para células en reposo, sin tratamiento previo, de memoria central o células que expresan un marcador que es CD28, CD62L, CCR7, CD127 o CD27, en comparación con la frecuencia de células de la respectiva población parental CD4+ o CD8+ en la muestra inicial del sujeto. El nivel relativo o la frecuencia de diversas poblaciones celulares en un sujeto puede determinarse basándose en la evaluación de la expresión en superficie de un marcador o marcadores presentes en dichas poblaciones o subpoblaciones. Pueden usarse varios métodos bien conocidos para evaluar el nivel de expresión de marcadores en superficie o proteínas, tales como la detección mediante métodos basados en afinidad, por ejemplo, métodos basados en inmunofluorescencia, por ejemplo, en el contexto de las proteínas de superficie celular, tal como mediante citometría de flujo.

En un caso de ejemplo, una muestra se enriquece en células CD4+ y CD8+/CD62L+ para producir una relación de CD4+ a CD8+ de 1:1. En este caso de ejemplo, la primera selección puede incluir enriquecer en células CD8+ usando una columna con una capacidad de adsorción ajustada para las frecuencias relativas de células CD4+ a células CD8+/CD62L+ que se sabe que están presentes en la muestra, o usando relaciones que generalmente se estima que están presentes en dichas muestras. Por ejemplo, la subpoblación CD62L+ de células CD8+ recogidas de un sujeto humano en ocasiones puede ser aproximadamente el 25 % de la fracción total de linfocitos T CD8+. Véase, por ejemplo, Maldonado, *Arthritis Res Ther.* 2003; 5(2): R91-R96. En un caso de este tipo, las columnas pueden organizarse para recoger 4 veces más células CD8+ que células CD4+ con el fin de generar una relación de inicio de cultivo de 1:1 de las células CD4+ y la subpoblación CD8+ que contiene además células CD62L+. Por lo tanto, suponiendo una capacidad y eficiencia de adsorción similares para cada columna de selección, la columna de CD8+ puede ser aproximadamente 4 veces más grande que la columna de selección de CD4 o la columna de selección de CD62L. El tamaño de las columnas también puede ajustarse según el rendimiento esperado. Por ejemplo, si cada columna tiene una eficiencia de sólo el 80 %, el tamaño de cada columna puede ajustarse para tener en cuenta la eficiencia de cada selección posterior.

Por ejemplo, una composición de inicio de cultivo deseada o elegida puede ser una que contenga 200×10^6 células CD4+ y 200×10^6 células CD8+/CD62L+. En este ejemplo, suponiendo las relaciones presentadas anteriormente, la muestra que ha de enriquecerse puede contener al menos o aproximadamente 200×10^6 células CD4+ y al menos o aproximadamente 800×10^6 células CD8+, aproximadamente el 25 % de las cuales (200×10^6) también puede ser CD62L+. Suponiendo que cada 2 ml de matriz de selección pueden enriquecerse aproximadamente en 200×10^6 células, una columna de selección de CD8 con 8 ml de matriz de selección puede unir aproximadamente 800×10^6 células CD8+ mientras el flujo continuo pasa a la columna de selección de CD4. Una columna de selección de CD4 con 2 ml de matriz de selección puede unir aproximadamente 200×10^6 células CD4+. Las células CD8+ pueden enriquecerse adicionalmente con CD62L eluyendo las células CD8+ en una columna de selección de CD62L. En este caso de ejemplo, la columna de selección de CD62L puede contener 2 ml de matriz de selección, enriqueciéndose por lo tanto en aproximadamente en 200×10^6 células CD8+/CD62L+. Las columnas de CD4 y CD8/CD62L pueden eluirse en un vaso de cultivo, produciendo la composición de cultivo de inicio o una composición que tiene aproximadamente una relación de inicio de cultivo de 1:1.

En otro caso de ejemplo, una muestra se enriquece en células CD4+ y CD8+/CCR7+ para producir una relación de CD4+ a CD8+ de 1:1. En este caso de ejemplo, la primera selección puede incluir enriquecer en células CD8+ usando una columna con una capacidad de adsorción ajustada para las frecuencias relativas de células CD4+ a células CD8+/CCR7+ que se sabe que están presentes en la muestra, o usando relaciones que generalmente se estima que están presentes en dichas muestras. Por ejemplo, la subpoblación CCR7+ de células CD8+ recogidas de un sujeto humano en ocasiones puede ser aproximadamente el 60 % de la fracción total de linfocitos T CD8+. Véase, por ejemplo, Chen, *Blood*. 1 de jul de 2001; 98(1):156-64. Las columnas pueden disponerse para recoger $3\frac{1}{2}$ veces más células CD8+ que células CD4+ para generar una relación de inicio de cultivo de 1:1. Suponiendo una capacidad y eficiencia de adsorción similares para cada columna de selección, la columna de CD8+ puede ser aproximadamente $3\frac{1}{2}$ veces más grande que la columna de selección de CD4 o la columna de selección de CCR7. El tamaño de las columnas también puede ajustarse según el rendimiento esperado. Por ejemplo, si cada columna tiene una eficiencia de sólo el 80 %, el tamaño de cada columna puede ajustarse para tener en cuenta la eficiencia de cada selección posterior.

Por ejemplo, un cultivo de inicio deseado puede contener 200×10^6 células CD4+ y 200×10^6 células CD8+/CCR7+. En este ejemplo, suponiendo las relaciones presentadas anteriormente, la muestra que ha de enriquecerse puede contener al menos 200×10^6 células CD4+ y al menos o aproximadamente $6,6 \times 10^6$ células CD8+, aproximadamente el 60 % de las cuales (200×10^6) también puede ser CCR7+. Suponiendo que cada 2 ml de matriz de selección puede enriquecerse en 200×10^6 células, una columna de selección de CD8 con $3\frac{1}{2}$ ml de matriz de selección puede unir aproximadamente $6,6 \times 10^6$ células CD8+ mientras el flujo continuo pasa a la columna de selección de CD4. Una columna de selección de CD4 con 2 ml de matriz de selección puede unir aproximadamente 200×10^6 células CD4+. Las células CD8+ pueden enriquecerse adicionalmente con CD62L eluyendo las células CD8+ en una columna de

selección de CCR7. En este caso de ejemplo, la columna de selección de CCR7 puede contener 1 ml de matriz de selección, enriqueciéndose por lo tanto en aproximadamente en 200×10^6 células CD8+/CCR7+. Las columnas de CD4 y CCR7 pueden eluirse en un vaso de cultivo, produciendo el cultivo de inicio que contiene aproximadamente 200×10^6 células CD4+ y aproximadamente 200×10^6 células CD8+/CCR7+, o una relación de inicio de cultivo de 1:1.

Está dentro del nivel de un experto seleccionar o elegir empíricamente un volumen, un diámetro o un número de columnas de cromatografía de matriz de afinidad adecuados para la primera y/o segunda y/o tercera selección dependiendo de la relación de inicio de cultivo deseada o elegida de la composición generada que contiene células enriquecidas o seleccionadas, la frecuencia esperada de cada subpoblación, las eficiencias variables de cada columna de selección y otros factores dentro del nivel del experto y en vista de la ejemplificación anterior.

B. Incubación de células aisladas

En algunos casos, los métodos divulgados incluyen una o más de diversas etapas para incubar células aisladas y poblaciones celulares, tales como poblaciones aisladas de acuerdo con los métodos del presente documento, tales como etapas para incubar una población aislada de linfocitos T CD4+, por ejemplo, población de linfocitos T CD4+ sin fraccionar o una o más subpoblaciones de la misma, y una población de linfocitos T CD8+ aislada, por ejemplo, población de linfocitos T CD8+ sin fraccionar aislada o una o más subpoblaciones de la misma. En algunos casos, las poblaciones de células se incuban en una composición de inicio de cultivo.

La pluralidad de poblaciones de células aisladas, por ejemplo, las poblaciones de células CD4+ y CD8+ (por ejemplo, sin fraccionar o subpoblaciones de las mismas) generalmente se incuban con las poblaciones celulares combinadas en una composición de inicio de cultivo en el mismo vaso de cultivo, tal como la misma unidad, cámara, pocillo, columna, tubo, conjunto de tuberías, válvula, vial, placa de cultivo, bolsa u otro recipiente para el cultivo o cultivar células.

En algunos casos, las poblaciones celulares o tipos celulares están presentes en la composición de inicio de cultivo en una relación de inicio de cultivo, por ejemplo, relación de células CD4+ y CD8+, diseñada para conseguir una relación de salida deseada particular, o una relación que esté dentro de un determinado intervalo de error tolerado de una relación de salida deseada de este tipo, siguiendo las etapas de incubación y/o modificación por ingeniería, o diseñada para hacerlo un determinado porcentaje del tiempo. La relación de salida, por ejemplo, puede ser una relación óptima para conseguir uno o más efectos terapéuticos tras la administración a un paciente, por ejemplo, a través de terapia celular adoptiva. En algunos casos, la relación de inicio de cultivo se determina empíricamente, por ejemplo, usando un método de determinación como se describe en el presente documento, por ejemplo, para determinar la relación de inicio de cultivo óptima para lograr una relación de salida deseada en un contexto particular.

Las etapas de incubación pueden incluir cultivar, 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 por ingeniería, tal como para la introducción de un receptor de antígenos modificadas por ingeniería genética.

Las condiciones pueden incluir uno o más de medios particulares, temperatura, contenido de oxígeno, contenido de dióxido de carbono, tiempo, agentes, por ejemplo, nutrientes, aminoácidos, antibióticos, iones y/o factores estimuladores, tales como citocinas, quimiocinas, antígenos, compañeros de unión, proteínas de fusión, receptores solubles recombinantes y cualquier otro agente diseñado para activar las células. En un ejemplo, las condiciones estimuladoras incluyen uno o más agentes, por ejemplo, ligando, que activan o inician la cascada de señalización intracelular de TCR/CD3 en un linfocito T. Dichos agentes pueden incluir anticuerpos, tales como los específicos para un componente de TCR y/o receptor coestimulador, por ejemplo, anti CD3, anti CD28, anti-4-1BB, por ejemplo, unidos 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 (por ejemplo, a una concentración de al menos aproximadamente 0,5 ng/ml). Opcionalmente, el método de expansión puede comprender además la etapa de añadir IL-2 y/o IL-15 y/o IL-7 y/o IL-21 al medio de cultivo (por ejemplo, en donde la concentración de IL-2 es de al menos aproximadamente 10 unidades/ml).

En algunos casos, la incubación se realiza de acuerdo con técnicas tales como las descritas en la Patente de los EE. UU. N.º 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.

En algunos casos, las poblaciones celulares, tal como las poblaciones o subpoblaciones de CD4+ y CD8+, se expanden añadiendo a la composición de inicio de cultivo células alimentadoras, tales como células mononucleares de sangre periférica que no se dividen (PBMC), (por ejemplo, de manera que la población celular resultante contenga al menos aproximadamente 5, 10, 20 o 40 o más células alimentadoras de PBMC por cada linfocito T en la población inicial que ha de expandirse); e incubar el cultivo (por ejemplo, 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 PBMC irradiadas con rayos gamma. En algunos casos, las PBMC 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.

- En algunos casos, las condiciones estimuladoras 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 en 37 grados Celsius, o aproximadamente. 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 añadir células linfoblastoides (LCL) transformadas con EBV que no se dividen como células alimentadoras. Las LCL pueden irradiarse con rayos gamma en el intervalo de aproximadamente 6000 a 10.000 rads.
- Las células alimentadoras LCL en algunos casos se divulgan en cualquier cantidad adecuada, tal como una relación de células alimentadoras LCL a linfocitos T iniciales de al menos aproximadamente 10:1.

- En unos casos, las poblaciones de CD4⁺ y CD8⁺ que son específicas de antígeno pueden obtenerse mediante estimulación de linfocitos T sin activación previa o específicos de antígeno con antígeno. Por ejemplo, pueden generarse estirpes 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 sin activación previa.

Evaluación provisional y ajuste

- En algunos casos, los métodos incluyen la evaluación y/o el ajuste de las células o de la composición que contiene las células, en un momento posterior al inicio de la incubación o el cultivo, tal como en un momento durante la incubación. La evaluación puede incluir la toma de una o más mediciones de una composición o vaso que contenga las células, tal como evaluar las células en cuanto a velocidad de proliferación, grado de supervivencia, fenotipo, por ejemplo, expresión de uno o más marcadores de superficie o intracelulares, tales como proteínas o polinucleótidos, y/o evaluar la composición o el vaso en cuanto a temperatura, uno o más componentes del medio, contenido de oxígeno o dióxido de carbono, y/o presencia o ausencia o cantidad o cantidad relativa de uno o más factores, agentes, componentes y/o tipos celulares, incluyendo subtipos. La evaluación en algunos casos incluye determinar una relación intermedia de una pluralidad, por ejemplo, dos tipos celulares, tales como linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, en la composición o vaso que se está incubando. En algunos casos, la evaluación se realiza de forma automatizada, por ejemplo, usando un dispositivo como se describe en el presente documento y/o se programa de antemano para realizarse en determinados puntos temporales durante la incubación. En algunos casos, el resultado de la evaluación, tal como una relación intermedia determinada de dos tipos de células, indica que debe realizarse un ajuste, tal como la adición o eliminación de uno o más tipos celulares.

- El ajuste puede incluir el ajuste de cualquier factor o parámetro del cultivo celular, tal como la temperatura, la duración (tiempo) en la que se realizará la incubación o una etapa de la misma (duración de la incubación), la reposición, adición y/o eliminación de uno o más componentes de la composición que se está incubando, por ejemplo, medio o tampón o componentes de los mismos, agentes, por ejemplo, nutrientes, aminoácidos, antibióticos, iones y/o factores estimuladores, tales como citocinas, quimiocinas, antígenos, compañeros de unión, proteínas de fusión, receptores solubles recombinantes, o células o tipos celulares o poblaciones de células. En algunos casos, la eliminación o adición de diversos componentes u otros ajustes se realiza de forma automatizada, por ejemplo, usando un dispositivo o sistema como se describe en el presente documento. En algunos casos, el sistema se programa de manera que se inicia automáticamente un ajuste basado en una determinada lectura de una evaluación provisional. Por ejemplo, en algunos casos, un sistema o dispositivo se programa para realizar una o más evaluaciones en un momento particular; en dichos casos, el sistema o dispositivo puede programarse además de manera que se obtenga un resultado particular de una evaluación de este tipo, tal como una relación particular de un tipo de célula con respecto a otro, inicie un ajuste particular, tal como la adición de uno o más de los tipos celulares.

- En algunos casos, el ajuste se realiza mediante adición o eliminación de manera que no altere un entorno cerrado que contiene las células y composiciones, tal como mediante válvulas de entrada y/o extracción, diseñadas para añadir o extraer componentes manteniendo la esterilidad, tal como en uno o más dispositivos o sistemas como se han descrito en el presente documento.

- En un caso particular, una relación provisional de linfocitos T CD4⁺ a CD8⁺ se evalúa durante el período de incubación. En algunos casos, la evaluación se realiza después de 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, tal como entre 3 y 5 días, y/o en un punto temporal en el que todas las células estén o se sospeche que estén en el ciclo celular. En algunos casos, la relación intermedia determinada de este modo indica que los linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺, tales como las células de la población aislada de linfocitos T CD4⁺ o de la población aislada de linfocitos T CD8⁺ (por ejemplo, una subpoblación, tal como linfocitos T CD8⁺ de memoria central), deben añadirse o enriquecerse en el vaso de cultivo o a la composición que se está incubando. Por lo tanto, en algunos casos, la evaluación va seguida de dicha adición o extracción, normalmente una adición. En algunos casos, a lo largo del curso de la incubación se realizan múltiples evaluaciones y posibles ajustes, por ejemplo, de manera iterativa.

- En algunos casos, donde se las células se modifican por ingeniería, por ejemplo, para introducir un receptor de antígenos modificado por ingeniería genética, la incubación en presencia de uno o más agentes estimuladores

continúa durante la fase de modificación por ingeniería.

En algunos casos, las células se incuban durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días, o aproximadamente, ya sea en su totalidad o antes de la modificación por ingeniería.

C. Modificación por ingeniería, receptores de antígenos modificados por ingeniería y células modificadas por ingeniería

En algunos casos, los métodos incluyen la modificación por ingeniería genética de las células aisladas y/o incubadas, tal como para introducir en las células genes recombinantes para la expresión de moléculas, tales como receptores, por ejemplo, receptores de antígenos, útiles en el contexto de la terapia adoptiva.

Entre los genes para la introducción se encuentran los que mejoran la eficacia de la terapia, tal como promoviendo la viabilidad y/o función de las células transferidas; genes para proporcionar un marcador genético para la selección y/o evaluación de las células, tal como para evaluar la supervivencia o localización *in vivo*; genes para mejorar la seguridad, por ejemplo, haciendo que la célula sea susceptible a la selección negativa *in vivo* como describe Lupton S. D. *et al.*, *Mol. and Cell Biol.*, 11:6 (1991); y Riddell *et al.*, *Human Gene Therapy* 3:319-338 (1992); véanse también las publicaciones PCT/US91/08442 y PCT/US94/05601 de Lupton *et al.* que describen el uso de genes de fusión seleccionables bifuncionales obtenidos de la fusión de un marcador seleccionable positivo dominante con un marcador seleccionable negativo. Esto puede realizarse de acuerdo con técnicas conocidas (véase, por ejemplo, Riddell *et al.*, Patente de los EE. UU. N.º 6.040.177, en las columnas 14-17) o variaciones de las mismas que serán evidentes para los expertos en la materia basándose en la presente divulgación.

La ingeniería generalmente incluye la introducción de un gen o genes para la expresión de un receptor de antígenos modificado por ingeniería genética. Entre dichos receptores de antígenos se encuentran receptores de linfocitos T (TCR) modificados por ingeniería genética y componentes de los mismos, y receptores de antígenos no TCR funcionales, tales como receptores de antígenos quiméricos (CAR).

El receptor de antígenos en algunos casos se une específicamente a un ligando en una célula o enfermedad diana, tal como un cáncer u otra enfermedad o afección, incluyendo los descritos en el presente documento para el direccionamiento con los métodos y composiciones divulgados. Los antígenos de ejemplo son el receptor de tirosina cinasa huérfano ROR1, tEGFR, Her2, LI-CAM, CD19, CD20, CD22, mesotelina, CEA y el antígeno de superficie de la hepatitis B, receptor anti-folato, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, EGP-2, EGP-4, OEPHa2, ErbB2, 3 o 4, FBP, receptor de acetilcolina e fetal, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-alfa, IL-13R-alfa2, kdr, cadena ligera kappa, Lewis Y, molécula de adhesión de células L1, MAGE-A1, mesotelina, MUC1, MUC16, PSCA, ligandos de NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, antígeno oncofetal, ROR1, TAG72, VEGF-R2, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno específico de próstata, PSMA, Her2/neu, receptor de estrógenos, receptor de progesterona, ephrinB2, CD123, CS-1, c-Met, GD-2 y MAGE A3 y/o moléculas biotiniladas, y/o moléculas expresadas por el VIH, el VHC, el VHB u otros patógenos.

Receptores de antígenos

En un caso, los receptores de antígenos diseñados son CAR. Los CAR generalmente incluyen receptores modificados por ingeniería genética que incluyen un dominio de unión de ligando extracelular unido a uno o más componentes de señalización intracelular. Dichas moléculas normalmente imitan o se aproximan a una señal a través de un receptor de antígenos natural y/o una señal a través de dicho receptor en combinación con un receptor coestimulador.

En algunos casos, los CAR se construyen con especificidad para un marcador particular, tal como un marcador expresado en un tipo celular particular al que se dirigirá mediante terapia adoptiva, por ejemplo, un marcador de cáncer. Esto se consigue en algunos casos mediante la inclusión en la porción extracelular del CAR de una o más moléculas de unión a antígeno, tales como uno o más fragmentos, dominios o porciones de unión a antígenos, o uno o más dominios variables de anticuerpos y/o moléculas de anticuerpos. En algunos casos, el CAR incluye una porción de unión a antígeno o porciones de una molécula de anticuerpo, tal como un fragmento de anticuerpo monocatenario (scFv) derivado de las cadenas pesada variable (VH) y ligera variable (VL) de un anticuerpo monoclonal (mAb).

En algunos casos, el CAR comprende un dominio de cadena pesada de anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de superficie celular de una célula o enfermedad diana, tal como una célula tumoral o una célula cancerosa, tal como cualquiera de los antígenos diana descritos en el presente documento o conocidos en la técnica.

En algunos casos, el antígeno tumoral o molécula de superficie celular es un polipéptido. En algunos casos, el antígeno tumoral o molécula de superficie celular se expresa selectivamente o se sobreexpresa en las células tumorales en comparación con las células no tumorales del mismo tejido.

En algunos casos, el CAR se une a un antígeno específico de patógeno. En algunos casos, el CAR es específico para antígenos víricos (tales como VIH, VHC, VHB, etc.), antígenos bacterianos y/o antígenos parasitarios.

En algunos casos, el componente de unión o reconocimiento específico de antígeno se une a uno o más dominios de señalización transmembrana e intracelular. En algunos casos, el CAR incluye un dominio transmembrana fusionado al dominio extracelular del CAR. En un caso, se usa el dominio transmembrana que se asocia de forma natural a uno de los dominios en el 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 proteínas de membrana de superficie o diferentes para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor.

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, CD 16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD 154. 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, hay presente 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, por ejemplo, doblete de glicina-serina, y forma una unión entre el dominio transmembrana y el dominio de señalización citoplásmica del CAR.

El CAR generalmente incluye uno o más componentes de señalización intracelular. En algunos casos, el CAR incluye un componente intracelular del complejo de TCR, tal como una cadena CD3* de TCR que media la activación y citotoxicidad de los linfocitos T, por ejemplo, cadena zeta de CD3. Por lo tanto, en algunos casos, la molécula 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 CD. En algunos casos, el CAR incluye además una porción de una o más moléculas adicionales tales como el receptor de dFc y, CD8, CD4, CD25 o CD16. Por ejemplo, en algunos casos, el CAR incluye una molécula quimérica entre CD3-zeta (CD3- ζ) o el receptor de Fc y y CD8, CD4, CD25 o CD16.

En algunos casos, tras la ligadura del CAR, el dominio citoplásmico o el dominio de señalización intracelular del CAR activa al menos una de las funciones efectoras normales de la célula inmunitaria, por ejemplo, el linfocito T modificado por ingeniería para expresar la célula. 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 auxiliares, tal como la secreción de citocinas u otros factores. En algunos casos, una porción truncada de un dominio de señalización intracelular de un componente del receptor de antígenos o una molécula coestimuladora. En algunos casos, dicha porción truncada se usa en lugar de una cadena inmunoestimuladora intacta, por ejemplo, si 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 dicho receptor para iniciar la transducción de señales después de la participación del receptor de antígenos, y/o cualquier derivado o variante de dichas moléculas, y/o cualquier secuencia sintética que tenga la misma capacidad funcional.

En el contexto de un TCR natural, la activación total generalmente requiere no sólo 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. 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 independientemente del antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora (secuencias de señalización citoplasmáticas secundarias). En algunos casos, el CAR incluye uno o ambos de dichos componentes de señalización.

En algunos casos, las secuencias de señalización citoplasmática primaria pueden regular la activación primaria del complejo de TCR de manera estimuladora o inhibidora. Las secuencias de señalización citoplasmáticas primarias que actúan de manera estimuladora pueden contener motivos de señalización que se conocen como motivos de activación de inmunorreceptores a base de tirosina o ITAM. Los ejemplos de ITAM que contienen secuencias de señalización citoplasmáticas primarias incluyen los derivadas de TCR zeta, FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CDS, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. En algunos casos, la molécula o moléculas de señalización citoplasmática en el CAR contienen un dominio de señalización citoplásmica, una porción del mismo o una secuencia derivada de CD3 zeta.

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 e ICOS.

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. En algunos casos, el dominio de señalización intracelular comprende dominios coestimuladores CD28 y CD137 quiméricos, unidos a un dominio intracelular de CD3.

En algunos casos, un CAR también puede incluir un marcador de transducción (por ejemplo, tEGFR). En algunos casos, el dominio de señalización intracelular de los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ es igual que el dominio de señalización intracelular de los linfocitos T CD4⁺ auxiliares. En algunos casos, el dominio de señalización intracelular de los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ es diferente del dominio de señalización intracelular de los linfocitos T CD4⁺ auxiliares.

En algunos casos, el CAR abarca dos o más dominios coestimuladores combinados con un dominio de activación, por ejemplo, un dominio de activación principal, en la porción citoplásmica. Un ejemplo es un receptor que incluye componentes intracelulares de CD3-zeta, CD28 y 4-1BB.

Los CAR y la producción e introducción de los mismos pueden incluir los descritos, por ejemplo, mediante las divulgaciones de patente publicadas WO200014257, US6451995, US2002131960, US7446190, US8252592, EP2537416, US2013287748 y WO2013126726, 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 linfocitos T se modifican con un receptor de linfocitos T recombinante. En algunos casos, el TCR recombinante es específico para un antígeno, generalmente un antígeno presente en una célula diana, tal como un antígeno específico de tumor, un antígeno expresado en un tipo celular particular asociado a una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria, o un antígeno derivado de un patógeno vírico o un patógeno bacteriano.

En algunos casos, los linfocitos T se modifican por ingeniería genética para expresar receptores de linfocitos T (TCR) clonados a partir de linfocitos T de origen natural. En algunos casos, un clon de linfocito T de alta afinidad para un antígeno diana (por ejemplo, un antígeno de cáncer) se identifica, se aísla de un paciente y se introduce en las células. En algunos casos, el clon de TCR para un antígeno diana se ha generado en ratones transgénicos modificados por ingeniería con genes del sistema inmunitario humano (por ejemplo, el sistema de antígeno leucocitario humano o HLA). Véase, por ejemplo, antígenos tumorales (véase, por ejemplo, Parkhurst *et al.* (2009) *Clin Cancer Res.* 15: 169-180 y Cohen *et al.* (2005) *J Immunol.* 175:5799-5808. En algunos casos, se usa presentación en fagos para aislar TCR contra un antígeno diana (véase, por ejemplo, Varela-Rohena *et al.* (2008) *Nat Med.* 14:1390-1395 y Li (2005) *Nat Biotechnol.* 23:349-354.

En algunos casos, una vez obtenido el clon de linfocitos T, las cadenas alfa y beta del TCR se aíslan y se clonan en un vector de expresión génica. En algunos casos, los genes de TCR alfa y beta se unen a través de un péptido de salto ribosómico del picornavirus 2A de manera que ambas cadenas se coexpresan. En algunos casos, la transferencia genética del TCR se logra a través de vectores retrovíricos o lentivíricos, o a través de transposones (véase, por ejemplo, Baum *et al.* (2006) *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy.* 13:1050-1063; Frecha *et al.* (2010) *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy.* 18:1748-1757; y Hackett *et al.* (2010) *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy.* 18:674-683.

En algunos casos, la transferencia génica se logra estimulando en primer lugar el crecimiento de linfocitos T y después las células activadas se transducen y se expanden en cultivo hasta alcanzar cantidades suficientes para aplicaciones clínicas.

En algunos contextos, la sobreexpresión de un factor estimulador (por ejemplo, una linfoquina o una citocina) puede ser tóxica para un sujeto. Por lo tanto, en algunos contextos, las células diseñadas genéticamente incluyen segmentos de genes que hacen que las células sean susceptibles a la selección negativa *in vivo*, tal como tras la administración en inmunoterapia adoptiva. Por ejemplo, en algunos casos, las células se modifican por ingeniería de manera que puedan eliminarse como resultado de un cambio en el estado *in vivo* del paciente al que se le administran. El fenotipo seleccionable negativo puede ser resultado de la inserción de un gen que confiere sensibilidad a un agente administrado, por ejemplo, un compuesto. Los genes seleccionables negativos incluyen el gen de la timidina cinasa del virus del herpes simple de tipo I (HSV-I TK, por sus siglas en inglés) (Wigler *et al.*, *Cell* 11: 223, 1977) que confiere sensibilidad al ganciclovir; el gen de la hipoxantina fosforribosiltransferasa celular (HPRT), el gen de la adenina fosforribosiltransferasa celular (APRT), citosina desaminasa bacteriana, (Mullen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:33 (1992)).

En algunos casos, las células se modifican por ingeniería adicional para promover la expresión de citocinas, tales como citocinas proinflamatorias, por ejemplo, IL-2, IL-12, IL-7, IL-15, IL-21.

Introducción de los componentes modificados por ingeniería genética

Se conocen bien diversos métodos para la introducción de componentes modificados por ingeniería genética, por ejemplo, receptores de antígenos, por ejemplo, CAR, y pueden usarse con los métodos y composiciones divulgados. Los métodos ilustrativos incluyen aquellos para la transferencia de ácidos nucleicos que codifican los receptores, incluyendo por vía vírica, por ejemplo, retrovírica o lentivírica, transducción, transposones y electroporación.

En algunos casos, los ácidos nucleicos recombinantes se transfieren a las células usando partículas víricas infecciosas

recombinantes, tales como, por ejemplo, vectores obtenidos del virus del simio 40 (SV40, por sus siglas en inglés), adenovirus, virus adenoasociado (AAV, por sus siglas en inglés). En algunos casos, los ácidos nucleicos recombinantes se transfieren a los linfocitos T usando vectores lentivíricos recombinantes o vectores retrovíricos, tales como vectores gamma-retrovíricos (véase, por ejemplo, Koste *et al.* (2014) *Gene Therapy*, 3 de abril de 2014. 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.* Noviembre de 2011; 29(11): 550-557.

En algunos casos, el vector retrovírico tiene una secuencia de repetición terminal larga (LTR, por sus siglas en inglés), por ejemplo, un vector retrovírico obtenido del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV, por sus siglas en inglés), el virus del sarcoma mieloproliferativo (MPSV, por sus siglas en inglés), el virus de células madre embrionarias murinas (MESV, por sus siglas en inglés), el virus de células madre murinas (MSCV, por sus siglas en inglés), el virus formador de focos del bazo (SFFV, por sus siglas en inglés) o el virus adenoasociado (AAV, por sus siglas en inglés). La mayoría de los vectores retrovíricos derivan de retrovirus murinos. En algunos casos, los retrovirus incluyen los derivados de cualquier fuente de células de aves o mamíferos. Los retrovirus normalmente son anfotrópicos, 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 el hueco retrovírico, las secuencias pol y/o env. Se han descrito varios sistemas retrovíricos ilustrativos (por ejemplo, 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 y Temin (1993) *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3:102-109.

Se conocen métodos de transducción lentivírica. Se describen métodos de ejemplo en, por ejemplo, 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, los ácidos nucleicos recombinantes se transfieren a los linfocitos T a través de electroporación (véase, por ejemplo, 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, por ejemplo, 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 (por ejemplo, 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 wolframio (Johnston, *Nature*, 346: 776-777 (1990)); y coprecipitación de ADN de fosfato de estroncio (Brash *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 7: 2031-2034 (1987)).

En algunos casos, el mismo CAR se introduce en cada uno de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. En algunos casos, se introduce un CAR diferente en cada uno de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. En algunos casos, el CAR en cada una de estas poblaciones tiene una molécula de unión a antígeno que se une específicamente al mismo antígeno. En algunos casos, el CAR en cada una de estas poblaciones se une a una molécula diferente. En algunos casos, el CAR en cada una de estas poblaciones tiene módulos de señalización celular que difieren. En algunos casos, cada uno de los linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ se han clasificado en linfocitos sin activación previa, de memoria central, de memoria efectora o efectoras antes de la transducción.

En otros casos, las células, por ejemplo, linfocitos T, no se modifica por ingeniería para expresar receptores recombinantes, sino que incluyen receptores de antígenos de origen natural específicos para los antígenos deseados, tales como linfocitos infiltrantes de tumores y/o linfocitos T cultivados *in vitro* o *ex vivo*, por ejemplo, durante una o más etapas de incubación, para promover la expansión de células que tienen una especificidad de antígeno particular. Por ejemplo, en algunos casos, las células se producen para terapia celular adoptiva mediante aislamiento de linfocitos T específicos de tumores, por ejemplo, linfocitos infiltrantes de tumores autólogos (TIL, por sus siglas en inglés). El direccionamiento directo de tumores humanos usando linfocitos infiltrantes de tumores autólogos puede, en algunos casos, mediar la regresión tumoral (véase Rosenberg SA, *et al.* (1988) *N Engl J Med.* 319:1676-1680). En algunos casos, los linfocitos se extraen de tumores extirpados. En algunos casos, dichos linfocitos se expanden *in vitro*. En algunos casos, dichos linfocitos se cultivan con linfocinas (por ejemplo, IL-2). En algunos casos, dichos linfocitos median en la lisis específica de células tumorales autólogas, pero no de células tumorales alogénas o células normales autólogas.

En algunos casos, las etapas de incubación y/o modificación por ingeniería y/o los métodos generalmente dan como resultado una relación de salida deseada (o una relación que está dentro de un error tolerado o una diferencia con respecto a una relación de este tipo), o lo hacen dentro de un determinado porcentaje del tiempo en que se realizan los métodos.

D. Crioconservación

En algunos casos, los métodos divulgados incluyen etapas para congelar, por ejemplo, crioconservar, las células, ya sea antes o después del aislamiento, incubación y/o modificación por ingeniería. 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, por ejemplo, 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. Un ejemplo implica el uso de PBS que contiene un 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 se congelan a -80 °C a una velocidad de 1° por minuto y se almacenan en la fase de vapor de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido.

II. Kits y sistemas

También se divulgan sistemas, aparatos y kits útiles para realizar los métodos divulgados. En un ejemplo, se divulga un sistema único que realiza uno o más de entre el aislamiento, preparación celular, separación, por ejemplo, separación basada en densidad, afinidad, sensibilidad a uno o más componentes u otra propiedad, lavado, procesamiento, incubación, cultivo y/o formulación de los métodos. En algunos casos, el sistema se usa para realizar cada una de estas etapas en un entorno cerrado o estéril, por ejemplo, para minimizar el error, la manipulación del usuario y/o la contaminación. En un ejemplo, el sistema es un sistema como se describe en la publicación de solicitud de patente Internacional número WO2009/072003 o el documento US 20110003380 A1.

En algunos casos, el sistema o aparato realiza una o más, por ejemplo, la totalidad, de las etapas de aislamiento, procesamiento, ingeniería y formulación en un sistema integrado o autónomo, y/o de forma automatizada o programable. En algunos casos, el sistema o aparato incluye un ordenador y/o un programa informático en comunicación con el sistema o aparato, que permite a un usuario programar, controlar, evaluar el resultado de y/o ajustar diversos casos de las etapas de procesamiento, aislamiento, modificación por ingeniería y formulación.

También se divulgan kits para realizar los métodos divulgados. En algunos casos, los kits incluyen anticuerpos u otros compañeros de unión, generalmente acoplados a soportes sólidos, para el aislamiento, por ejemplo, para etapas de separación basada en inmunoafinidad, de los métodos.

En algunos casos, el kit comprende anticuerpos para la selección positiva y negativa, unidos a perlas magnéticas. En un caso, el kit comprende instrucciones para realizar la selección partiendo de una muestra, tal como una muestra de PBMC, mediante la selección basada en la expresión de un primer marcador de superficie, reconocido por uno o más de los anticuerpos divulgados con el kit, conservando fracciones tanto positivas como negativas. En algunos casos, las instrucciones incluyen además instrucciones para realizar una o más etapas de selección adicionales, comenzando con las fracciones positivas y/o negativas derivadas de las mismas, por ejemplo, manteniendo al mismo tiempo las composiciones en un entorno contenido y/o en el mismo vaso de separación.

En un caso, un kit incluye anticuerpos anti-CD4, anti CD14, anti CD45RA, anti-CD14 y anti-CD62L, unidos a perlas magnéticas. En un caso, el kit comprende instrucciones para realizar la selección partiendo de una muestra, tal como una muestra de PBMC, mediante selección basándose en la expresión de CD4, conservando las fracciones tanto positivas como negativas, y en la fracción negativa, sometiendo además la fracción a una selección negativa usando los anticuerpos anti-CD14, anti-CD45RA y una selección positiva usando el anticuerpo anti-CD62L, en cualquier orden. Como alternativa, los componentes e instrucciones se ajustan de acuerdo con cualquiera de las instancias de separación descritas en el presente documento.

En algunos casos, el kit incluye además instrucciones para transferir las células de las poblaciones aisladas mediante las etapas de selección a un vaso de cultivo o procesamiento, manteniendo al mismo tiempo las células en un sistema autónomo. En algunos casos, el kit incluye instrucciones para transferir las diferentes células aisladas en una relación particular.

III. Células, composiciones y métodos de administración

También se divulgan células, poblaciones celulares y composiciones (incluyendo composiciones farmacéuticas y terapéuticas) que contienen las células y poblaciones, producidas mediante los métodos divulgados. También se divulgan métodos, por ejemplo, métodos terapéuticos para administrar las células y composiciones a sujetos, por ejemplo, pacientes.

Se divulgan métodos de administración de las células, poblaciones, composiciones y usos de dichas células, poblaciones y composiciones para tratar o prevenir enfermedades, afecciones y trastornos, incluyendo cánceres. En algunos casos, las células, poblaciones y composiciones se administran a un sujeto o paciente que tiene la enfermedad o afección particular que ha de tratarse, por ejemplo, a través de terapia celular adoptiva, tal como la terapia adoptiva de linfocitos T. En algunos casos, las células y composiciones preparadas mediante los métodos divulgados, tales como composiciones modificadas por ingeniería y composiciones de fin de producción después de la incubación y/u otras etapas de procesamiento se administran a un sujeto, tal como un sujeto que tiene o está en riesgo de tener la enfermedad o afección. En algunos casos, los métodos de ese modo tratan, por ejemplo, mejoran uno o más síntomas de, la enfermedad o afección, tal como disminuyendo la carga tumoral en un cáncer que expresa un antígeno

reconocido por un linfocito T modificado por ingeniería.

Se conocen métodos para la administración de células para terapia celular adoptiva y pueden usarse en relación con los métodos y composiciones divulgados. Por ejemplo, se describen métodos de terapia adoptiva de linfocitos T, por ejemplo, en la Publicación de solicitud de patente de los EE. UU. N.º 2003/0170238 de Gruenberg *et al.*; la Patente de los EE. UU. N.º 4.690.915 de Rosenberg; Rosenberg (2011) *Nat Rev Clin Oncol.* 8(10):577-85). Véanse, por ejemplo, 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 algunos casos, la terapia celular, por ejemplo, la terapia adoptiva de linfocitos T, se realiza mediante transferencia autóloga, en la que 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, por ejemplo, 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, por ejemplo, la terapia adoptiva de linfocitos T, se realiza mediante transferencia alógena, en la que 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, por ejemplo, un primer sujeto. En dichos casos, las células después se administran a un sujeto diferente, por ejemplo, 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.

En algunos casos, el sujeto, por ejemplo, paciente, a quien se le administran las 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 mamífero no primate, tal como un roedor.

También se divulgan composiciones farmacéuticas para su uso en dichos métodos.

Entre las enfermedades, afecciones y trastornos para el tratamiento con las composiciones, células, métodos y usos divulgados son tumores, incluyendo tumores sólidos, neoplasias hematológicas y melanomas, y enfermedades infecciosas, tales como una infección por un virus u otro patógeno, por ejemplo, el VIH, el VHC, el VHB, en CMV y enfermedades parasitarias. En algunos casos, la enfermedad o afección es un tumor, cáncer, malignidad, neoplasia u otra enfermedad proliferativa. Dichas enfermedades incluyen, pero sin limitación, leucemia, linfoma, por ejemplo, leucemia linfocítica crónica (LLC), LLA, linfoma no Hodgkin, leucemia mieloide aguda, mieloma múltiple, linfoma folicular refractario, linfoma de células del manto, linfoma de linfocitos B indolentes, neoplasias malignas de linfocitos B, cánceres de colon, pulmón, hígado, mama, próstata, ovarios, piel (incluyendo melanoma), huesos y cáncer de cerebro, cáncer de ovario, cánceres epiteliales, carcinoma de células renales, adenocarcinoma pancreático, linfoma de Hodgkin, carcinoma de cuello de útero, cáncer colorrectal, glioblastoma, neuroblastoma, sarcoma de Ewing, meduloblastoma, osteosarcoma, sarcoma sinovial y mesotelioma.

En algunos casos, la enfermedad o afección es una enfermedad o afección infecciosa, tales como, pero sin limitación, infecciones víricas, retrovíricas, bacterianas y protozoarias, inmunodeficiencia, citomegalovirus (CMV), virus de Epstein Barr (EBV, por sus siglas en inglés), adenovirus, poliomavirus BK. En algunos casos, la enfermedad o afección es una enfermedad o afección autoinmunitaria o inflamatoria, tales como artritis, por ejemplo, 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 del grupo que consiste en el receptor huérfano de tirosina cinasa ROR1, tEGFR, Her2, LI-CAM, CD19, CD20, CD22, mesotelina, CEA y el antígeno de superficie de la hepatitis B, receptor anti-folato, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, EGP-2, EGP-4, 0EPHa2, ErbB2, 3 o 4, FBP, receptor de acetilcolina e fetal, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-alfa, IL-13R-alfa2, kdr, cadena ligera kappa, Lewis Y, molécula de adhesión de células L1, MAGE-A1, mesotelina, MUC1, MUC16, PSCA, ligandos de NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, antígeno oncofetal, ROR1, TAG72, VEGF-R2, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno específico de próstata, PSMA, Her2/neu, receptor de estrógenos, receptor de progesterona, ephrinB2, CD123, CS-1, c-Met, GD-2 y MAGE A3 y/o moléculas biotiniladas, y/o moléculas expresadas por el VIH, el VHC, el VHB u otros patógenos.

En algunos casos, las células y composiciones se administran a un sujeto en forma de una composición farmacéutica, tal como una composición que comprende las células o poblaciones celulares y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas en algunos casos comprenden adicionalmente otros agentes o fármacos farmacéuticamente activos, tales como agentes quimioterápicos, por ejemplo, asparaginasa, busulfán, carboplatino, cisplatino, daunorrubicina, doxorubicina, fluorouracilo, gemcitabina, hidroxiurea, metotrexato,

paclitaxel, rituximab, vinblastina, vincristina, etc. En algunos casos, los agentes se administran en forma de una sal, por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable. Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen las derivadas de ácidos minerales, tales como los ácidos clorhídrico, bromhídrico, fosfórico, metafosfórico, nítrico y sulfúrico, y ácidos orgánicos, tales como los ácidos tartárico, acético, cítrico, málico, láctico, fumárico, benzoico, glicólico, glucónico, succínico y arilsulfónico, por ejemplo, ácido p-toluenosulfónico.

La elección del vehículo en la composición farmacéutica se determina en parte por el CAR o TCR modificado por ingeniería particular, vector o células que expresan el CAR o TCR, así como mediante el método particular utilizado para administrar el vector o las células hospedadoras que expresan el CAR. 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.

Además, los agentes tamponantes en algunos aspectos se incluyen en la composición. Los agentes tamponantes 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 tamponantes. El agente tamponante 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 de ejemplo con más detalle en, por ejemplo, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott Williams & Wilkins; 21.^a ed. (1 de mayo de 2005).

En determinados casos, la composición farmacéutica se formula en forma de un complejo de inclusión, tal como el complejo de inclusión de ciclodextrina o en forma de un liposoma. Los liposomas pueden servir para dirigir las células hospedadoras (por ejemplo, linfocitos T o linfocitos NK) a un tejido particular. Existen muchos métodos disponibles para preparar liposomas, tales como los descritos en, por ejemplo, Szoka *et al.*, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 9: 467 (1980) y las Patentes de los EE. UU. 4.235.871, 4.501.728, 4.837.028 y 5.019.369.

En algunos casos, la composición farmacéutica emplea sistemas de suministro de liberación prolongada, liberación retardada y/o liberación sostenida, de manera que el suministro de la composición se produzca antes y con tiempo suficiente para provocar, la sensibilización del sitio que ha de tratarse. Hay disponibles muchos tipos de sistemas de suministro de liberación y son conocidos por los expertos en la materia. En algunos casos, dichos sistemas pueden evitar administraciones repetidas de la composición, aumentando de este modo la comodidad para el sujeto y el médico.

En algunos casos, la composición farmacéutica comprende las células o poblaciones celulares en una cantidad que es eficaz para tratar o prevenir la enfermedad o afección, tal como una cantidad terapéuticamente eficaz o profilácticamente eficaz. Por lo tanto, en algunos casos, los métodos de administración incluyen la administración de las células y poblaciones en cantidades eficaces. La eficacia terapéutica o profiláctica en algunas realizaciones se controla mediante la evaluación periódica de los sujetos tratados. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, se repite el tratamiento hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de enfermedad. Sin embargo, pueden ser útiles y pueden determinarse otras pautas de dosificación. La dosificación deseada puede suministrarse mediante una única administración en embolada de la composición, mediante múltiples administraciones en embolada de la composición o mediante la administración por infusión continua de la composición.

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 relación 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 relación deseada de las poblaciones o subtipos individuales, tales como la relación de CD4⁺ a 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 dichas características, tales como un número deseado de células totales, relación 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 por ejemplo 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, por ejemplo, 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 o subtipos individuales están presentes en una relación de salida deseada (tal como una relación de CD4⁺ a CD8⁺) o próxima a ella, por ejemplo, dentro de una diferencia o un error tolerados determinados de una relación 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 o subtipos individuales de células, tal como una dosis deseada de células CD4⁺ y/o una dosis deseada de células 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, por ejemplo, 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.

Por lo tanto, en algunos casos, la dosificación se basa en una dosis fija deseada de células totales y una relación deseada, y/o se basa en una dosis fija deseada de uno o más, por ejemplo, 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 relación deseada de células CD4⁺ a CD8⁺, y/o se basa en una dosis fija o mínima deseada de células CD4⁺ y/o CD8⁺.

En determinados casos, las células o poblaciones individuales de subtipos de células, se les administran al sujeto en un intervalo de aproximadamente un millón a aproximadamente 100.000 millones de células, tales como, por ejemplo, de 1 millón a aproximadamente 50.000 millones de células (por ejemplo, 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 100.000 millones de células (por ejemplo, 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 (por ejemplo, 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.

En algunos casos, la dosis de células totales y/o la dosis de subpoblaciones individuales de células está dentro de un intervalo de entre 10^4 , o aproximadamente, y 10^9 células/kilogramos (kg), o aproximadamente, de peso corporal, tal como entre 10^5 y 10^6 células/kg de peso corporal, por ejemplo, en 1×10^5 células/kg, $1,5 \times 10^5$ células/kg, 2×10^5 células/kg o 1×10^6 células/kg de peso corporal, o aproximadamente. Por ejemplo, en algunos casos, las células se administran en, o dentro de un determinado intervalo de error de, entre 10^4 , o aproximadamente, y 10^9 , o aproximadamente, linfocitos T/kilogramos (kg) de peso corporal, tal como entre 10^5 y 10^6 linfocitos T/kg de peso corporal, por ejemplo, en 1×10^5 linfocitos T/kg, $1,5 \times 10^5$ linfocitos T/kg, 2×10^5 linfocitos T/kg o 1×10^6 linfocitos T/kg de peso corporal, o aproximadamente.

En algunos casos, las células se administran en o dentro de un determinado intervalo de error de entre en o aproximadamente 10^4 y en o aproximadamente 10^9 células CD4⁺ y/o CD8⁺ células/kilogramos (kg) de peso corporal, tal como entre 10^5 y 10^6 células CD4⁺ y/o CD8⁺/kg de peso corporal, por ejemplo, en o aproximadamente 1×10^5 células CD4⁺ y/o CD8⁺/kg, $1,5 \times 10^5$ células CD4⁺ y/o CD8⁺/kg, 2×10^5 células CD4⁺ y/o CD8⁺/kg o 1×10^6 células CD4⁺ y/o CD8⁺/kg de peso corporal.

En algunos casos, las células se administran en o dentro de un determinado intervalo de error de, superior a y/o de al menos aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente $2,5 \times 10^6$, aproximadamente 5×10^6 , aproximadamente $7,5 \times 10^6$ o aproximadamente 9×10^6 células CD4⁺ y/o al menos aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente $2,5 \times 10^6$, aproximadamente 5×10^6 , aproximadamente $7,5 \times 10^6$ o aproximadamente 9×10^6 células CD8⁺ y/o al menos aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente $2,5 \times 10^6$, aproximadamente 5×10^6 , aproximadamente $7,5 \times 10^6$ o aproximadamente 9×10^6 linfocitos T. En algunos casos, las células se administran en o dentro de un determinado intervalo de error de entre aproximadamente 10^8 y 10^{12} o entre aproximadamente 10^{10} y 10^{11} linfocitos T, entre aproximadamente 10^8 y 10^{12} o entre aproximadamente 10^{10} y 10^{11} células CD4⁺, y/o entre aproximadamente 10^8 y 10^{12} o entre aproximadamente 10^{10} y 10^{11} células CD8⁺.

En algunos casos, las células se administran en o dentro de un intervalo tolerado de una relación de salida deseada de múltiples poblaciones o subtipos celulares, tales como células o subtipos CD4⁺ y CD8⁺. En algunos casos, la relación deseada puede ser una relación específica o puede ser un intervalo de relaciones, por ejemplo, en algunos casos, la relación deseada (por ejemplo, la relación de células CD4⁺ a CD8⁺) está entre en 5:1, o aproximadamente, y en 5:1, o aproximadamente (o más de aproximadamente 1:5 y menos de aproximadamente 5:1), o entre en 1:3, o aproximadamente, y en 3:1, o aproximadamente (o más de aproximadamente 1:3 y menos de aproximadamente 3:1), tal como entre en 2:1, o aproximadamente, y en 1:5, o aproximadamente (o más de aproximadamente 1:5 y menos de aproximadamente 2:1, tal como en 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, o aproximadamente. 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 relación deseada, incluyendo cualquier valor entre estos intervalos.

5 Las poblaciones y composiciones celulares en algunos casos se administran a un sujeto usando técnicas de administración convencionales, incluyendo la administración oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, pulmonar, transdérmica, intramuscular, intranasal, bucal, sublingual o mediante supositorios. En algunos casos, las poblaciones celulares se administran por vía parenteral. El término "parenteral", como se usa en el presente documento, incluye la
10 administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, rectal, vaginal e intraperitoneal. En algunos casos, las poblaciones de células se administran a un sujeto usando el suministro sistémico periférico mediante inyección intravenosa, intraperitoneal o subcutánea.

15 Las poblaciones celulares obtenidas usando los métodos descritos en el presente documento en algunos casos se coadministran con uno o más agentes terapéuticos adicionales o en conexión con 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 potencien el efecto de uno o más agentes terapéuticos adicionales, o viceversa. En algunos casos, las poblaciones de células se administran antes que el uno o más agentes terapéuticos adicionales. En algunos casos, las poblaciones de células se administran
20 después del uno o más agentes terapéuticos adicionales.

Después de la administración de las células, en algunos casos se mide la actividad biológica de las poblaciones celulares modificadas por ingeniería, por ejemplo, mediante cualquiera de una serie de métodos conocidos. Los parámetros a evaluar incluyen la unión específica de un linfocito T natural o modificado por ingeniería u otra célula inmunitaria al antígeno, *in vivo*, por ejemplo, mediante formación de imágenes, o *ex vivo*, por ejemplo, mediante ELISA o citometría de flujo. En determinados casos, la capacidad de las células modificadas por ingeniería 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
25 sometiéndolo a ensayo la expresión y/o secreción de una o más citocinas, tales como CD 107a, IFN γ , IL-2 y TNF. En algunos casos, la actividad biológica se mide evaluando el resultado clínico, tal como la reducción de la carga o carga tumoral.

En determinados casos, las células modificadas por ingeniería se modifican de diversas formas, de manera que se aumenta su eficacia terapéutica o profiláctica. Por ejemplo, el CAR o TCR modificado por ingeniería expresado por la población puede conjugarse directa o indirectamente a través de un enlazador con un resto de direccionamiento. La práctica de conjugar compuestos, por ejemplo, el CAR o TCR, con restos de direccionamiento es conocida en la técnica. Véanse, por ejemplo, Wadwa *et al.*, *J. Drug Targeting* 3: 1 1 1 (1995) y la Patente de los EE. UU. 5.087.616.

40 **IV. Definiciones**

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

A lo largo de la presente divulgación, diversos aspectos 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 independientemente en los intervalos más pequeños, y también están englobados dentro de la materia objeto
50 reivindicada, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo establecido. 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.

60 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) realizaciones que se refieren a ese valor o parámetro en sí.

65 Como se usan en el presente documento, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen las referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por ejemplo, "un" o "una" significa "al menos uno/una" o

"uno/una o más".

A lo largo de la presente divulgación, diversos aspectos 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 independientemente en los intervalos más pequeños, y también están englobados dentro de la materia objeto reivindicada, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo establecido. 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 usan en el presente documento, "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" y "porcentaje de identidad" cuando se usan con respecto a una secuencia de aminoácidos (secuencia de polipéptido de referencia) se definen como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata (por ejemplo, una muteína de estreptavidina) que son idénticos a los restos de aminoácidos en la secuencia polipeptídica de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, en caso necesario, para conseguir el porcentaje máximo de identidad de secuencia y sin tener en cuenta ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación para determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede conseguirse de diversas maneras que se encuentran dentro de las capacidades del experto en la materia, por ejemplo, usando programas informáticos disponibles de manera pública, tales como los programas BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros adecuados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se estén comparando.

Una sustitución de aminoácidos puede incluir la sustitución de un aminoácido en un polipéptido por otro aminoácido. Los aminoácidos generalmente pueden agruparse de acuerdo con las siguientes propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) restos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones de aminoácidos no conservadoras implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

Como se usan en el presente documento, un sujeto incluye cualquier organismo vivo, tal como seres humanos y otros mamíferos. Los mamíferos incluyen, pero sin limitación, seres humanos y animales no humanos, incluyendo animales de granja, animales para el deporte, roedores y mascotas.

Como se usan 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 usan en el presente documento, "empobrecimiento" cuando se refiere a uno o más tipos celulares o poblaciones celulares particulares, se refiere a disminuir el número o porcentaje del tipo o población celular, por ejemplo, en comparación con el número total de células o el volumen de la composición, o en relación con otros tipos celulares, tal como mediante selección negativa basada en marcadores expresados por la población o célula, o mediante selección positiva basada en un marcador no presente en la población celular o célula que ha de empobrecerse. El término no requiere la eliminación total de la célula, tipo celular o población de la composición.

Como se usan 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, por ejemplo, en comparación con el número total de células o el volumen de la composición, o en relación con 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 usan en el presente documento, las expresiones "tratamiento", "tratar", y "en tratamiento", se refieren a la mejora o reducción completa o parcial de una enfermedad o afección o trastorno, o de un síntoma, efecto o resultado adverso, o fenotipo asociado al mismo. En determinadas realizaciones, el efecto es terapéutico, de manera que cura parcial o totalmente una enfermedad o afección o síntoma adverso atribuible a la misma.

Como se usan en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto o composición o combinación se refiere a una cantidad eficaz, en las dosificaciones y durante los períodos 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.

Como se usan 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 mediante 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 usa 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 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 ausencia de expresión superficial detectada mediante 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.

En algunas realizaciones, una disminución en la expresión de uno o marcadores se refiere a la pérdida de $1 \log^{10}$ en la intensidad de fluorescencia media y/o disminución del porcentaje de células que presentan el marcador de al menos el 20 % de las células, el 25 % de las células, el 30 % de las células, el 35 % de las células, el 40 % de las células, el 45 % de las células, el 50 % de las células, el 55 % de las células, el 60 % de las células, el 65 % de las células, el 70 % de las células, el 75 % de las células, el 80 % de las células, el 85 % de las células, el 90 % de las células, el 95 % de las células y el 100 % de las células y cualquier % entre el 20 y el 100 % en comparación con una población celular de referencia. En algunas realizaciones, una población celular positiva para uno o varios marcadores se refiere a un porcentaje de células que presentan el marcador de al menos el 50 % de las células, el 55 % de las células, el 60 % de las células, el 65 % de las células, el 70 % de las células, el 75 % de las células, el 80 % de las células, el 85 % de las células, el 90 % de las células, el 95 % de las células y el 100 % de las células y cualquier % entre el 50 y el 100 % en comparación con una población celular de referencia.

VI. Ejemplos

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

Ejemplo 1: Generación de una composición de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ usando un único flujo de proceso mediante separación inmunomagnética para modificación por ingeniería genética y terapia celular adoptiva

En un método de ejemplo, una población de linfocitos T CD4⁺ y una población de linfocitos T CD8⁺, enriquecidas en linfocitos T de memoria central, se aíslan de una muestra de producto de aféresis y posteriormente se incuban y se modificadas por ingeniería, seguido de la administración a un sujeto. El procedimiento de aislamiento se realiza usando un único flujo de proceso mediante separación inmunomagnética usando el sistema CliniMACS® Prodigy. El proceso se simplifica en comparación con otros métodos, en los que las células CD4⁺ se separan de una primera fracción de aféresis y las células CD8⁺ se separan y se empobrecen/enriquecen adicionalmente, de una segunda fracción de aféresis, usando un dispositivo CliniMACS® Prodigy y tres conjuntos de tuberías separados.

El proceso simplificado se realiza usando un conjunto de tuberías para el aislamiento de las poblaciones de células CD4⁺ y CD8⁺, sin transferir las poblaciones de células de un vaso (por ejemplo, conjunto de tuberías) a otro.

La población de células CD4⁺ se aísla incubando una muestra de aféresis con un reactivo de CD4 CliniMACS®.

Después, las células se separan mediante el dispositivo CliniMACS® Prodigy configurado para ejecutar un programa de enriquecimiento y se conservan ambas fracciones celulares (es decir, la fracción de células CD4⁺ enriquecidas seleccionada inmunomagnéticamente y la fracción de células de flujo continuo). La fracción enriquecida (positiva) es una población de linfocitos T CD4⁺ aislada. Una población de linfocitos T CD8⁺ se aísla incubando la fracción de flujo continuo (negativa) con un reactivo CliniMACS® CD14 y un reactivo CliniMACS® CD45RA o reactivo CD19. El dispositivo CliniMACS® Prodigy se configura para ejecutar un programa de empobrecimiento. Después, la mezcla de células y reactivos se separa mediante el dispositivo CliniMACS® Prodigy usando el mismo conjunto de tuberías utilizado en la primera etapa de separación. La fracción de flujo continuo (negativa) en la que se han agotado células CD14⁺/CD45RA⁺ o CD14⁺/CD19⁺ se incuba con reactivo CliniMACS® CD62L. La mezcla célula/reactivo se separa usando el dispositivo CliniMACS® Prodigy ejecutando un programa de enriquecimiento usando el mismo conjunto de tuberías. La fracción positiva es una población de células CD8⁺ aislada enriquecida en células de memoria central.

Las poblaciones de CD4⁺ y CD8⁺ aisladas se combinan en el mismo vaso de cultivo en una composición de inicio de cultivo en una relación de inicio de cultivo. La relación de inicio de cultivo se diseña para conseguir una relación de salida deseada particular, o una relación que esté dentro de un determinado intervalo de error tolerado de una relación de salida deseada de este tipo, siguiendo las etapas de incubación y/o modificación por ingeniería, o diseñada para hacerlo un determinado porcentaje del tiempo. Las células se incuban en condiciones estimuladoras, tales como usando perlas anti-CD3/anti-CD28 en presencia de IL-2 (100 UI/ml) durante 72 horas a 37 °C, dentro del sistema Prodigy.

La composición celular opcionalmente se evalúa y/o ajusta periódicamente en uno o más momentos posteriores al inicio de la incubación o el cultivo, tal como en un momento durante la incubación. La evaluación incluye medir la velocidad de proliferación, medir el grado de supervivencia, determinar el fenotipo, por ejemplo, la expresión de uno o más marcadores de superficie o intracelulares, tales como proteínas o polinucleótidos, y/o ajustar la composición o el vaso para temperatura, uno o más componentes del medio, contenido de oxígeno o dióxido de carbono, y/o presencia o ausencia o cantidad o cantidad relativa de uno o más factores, agentes, componentes y/o tipos celulares, incluyendo subtipos.

Las células incubadas de este modo después se modifican por ingeniería genética, introduciendo en las células genes recombinantes para la expresión de receptores de antígenos recombinantes, tales como receptores de antígenos quiméricos (CAR) o TCR recombinantes. La introducción se realiza en el entorno contenido dentro del dispositivo CliniMACS® Prodigy, con células CD4⁺ y CD8⁺ presentes en la misma composición y vaso. El método da como resultado una composición de salida con linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ modificados por ingeniería.

Ejemplo 2: Generación de una composición de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ mediante purificación secuencial en un sistema cerrado

Este ejemplo demuestra un método de ejemplo de enriquecimiento o selección de una población de linfocitos T CD4⁺ y una población de linfocitos T CD8⁺ a partir de una muestra de producto de aféresis obtenida de un sujeto. El proceso se realiza usando un sistema cerrado con múltiples columnas de cromatografía para la selección positiva secuencial de las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de la misma muestra de partida.

A. Enriquecimiento en la población de linfocitos T CD4⁺ y en la población de linfocitos T CD8⁺

En el proceso de ejemplo, como se representa en la Figura 1A, una serie de columnas de selección inmunocromatográfica y columnas de extracción se disponen en un aparato cerrado **14** conectadas operativamente entre sí y con una bomba peristáltica **8** a través de diversas líneas de tuberías y válvulas **13** para controlar el flujo de la fase líquida.

La primera columna de selección **1** contiene un volumen elegido de una matriz de cromatografía de afinidad **3**, tal como una resina de agarosa, tal como una resina como se describe en la Solicitud de patente de los EE. UU. N.º US2015/0024411 para el aislamiento de linfocitos T, tal como una con un límite de exclusión diseñado para ser superior al tamaño de un linfocito T, tal como una agarosa obtenida de Agarose Beads Technologies, Madrid, España, con un tamaño de exclusión reducido en comparación con Agarose Superflow™, que tiene un tamaño de exclusión de 6×10^6 Dalton. La matriz de la primera columna está unida a multímeros de Strep-Tactin® (por ejemplo, que contiene un mutante de estreptavidina expuesto en cualquiera de las SEQ ID NO: 12, 13, 15 o 16, IBA GmbH, Alemania o como se describe en la Solicitud PCT internacional publicada N.º WO 2014/076277). La segunda columna de selección **2** contiene un volumen elegido de una matriz de cromatografía de afinidad **4**, tal como una resina de agarosa, tal como una resina como se ha descrito anteriormente, que también está unida a multímeros de Strep-Tactin®.

Un depósito que contiene un fragmento Fab **18** anti-CD8 se carga para pasar por la bomba **8**, tuberías y válvulas **13** de tal manera que el Fab anti-CD8 se aplica a la primera columna de selección **1**, por lo que el Fab anti-CD8 queda inmovilizado en la Strep-Tactin® en la matriz de afinidad **3** con un Twin Strep-Tag® (por ejemplo, expuesto en la SEQ ID NO: 10; IBA GmbH) en el Fragmento Fab, que se fusiona con el extremo carboxiterminal de su cadena pesada (véase, por ejemplo, la Solicitud de patente de los EE. UU. publicada N.º US2015/0024411). En algunas realizaciones, un tampón de lavado de un depósito **6** de tampón de lavado, tal como solución salina tamponada con fosfato (PBS)

que contiene albúmina sérica bovina al 0,5 %, albúmina sérica humana o albúmina sérica humana recombinante, se carga para pasar a través de la primera columna de selección a través de una tubería acoplada operativamente. El flujo continuo se dirige al recipiente **10** de residuos a través de válvulas **13** que conectan operativamente la primera columna de selección y el recipiente de residuos. En algunas realizaciones, la etapa de lavado se repite preferentemente una pluralidad de veces.

Un depósito que contiene un fragmento Fab **19** anti-CD4 se carga para pasar por la bomba **8**, tuberías y válvulas **13** de tal manera que el Fab anti-CD4 se aplica a la segunda columna de selección **2**, por lo que el Fab anti-CD8 queda inmovilizado en la Strep-Tactin® en la matriz de afinidad **4** con un Twin Strep-Tag®. En algunas realizaciones, un tampón de lavado de un depósito **6** de tampón de lavado se hace pasar a través de la segunda columna de selección a través de tuberías acopladas operativamente. El flujo continuo se dirige al recipiente **10** de residuos a través de válvulas **13** que conectan operativamente la segunda columna de selección y el recipiente de residuos. En algunas realizaciones, la etapa de lavado se repite preferentemente una pluralidad de veces.

El volumen del reactivo de matriz de afinidad contenido en la primera columna de selección y la segunda columna de selección puede ser igual o diferente, y puede elegirse basándose en el rendimiento deseado de la selección y/o la relación deseada de células CD4+ a células CD8+ después de la selección. El volumen elegido de este modo se basa en un supuesto de un rendimiento promedio de 1×10^8 células capaces de selección por cada 1 ml de volumen de columna llena. En un proceso de ejemplo, los volúmenes de columna eran los mismos, por ejemplo, usando un volumen de 2 ml para la columna para el fragmento Fab anti-CD8 y una columna de 2 ml para el fragmento Fab anti-CD4. La longitud de la columna y/o el diámetro de la columna pueden elegirse para adaptarse al volumen deseado, por ejemplo, para conseguir una relación de inicio de cultivo deseada de células CD4+ a células CD8+. En algunas realizaciones, para acomodar el volumen de la matriz de afinidad, puede añadirse una pluralidad de columnas que tengan inmovilizado en ellas el mismo reactivo de Fab directamente en serie y conectarlas operativamente entre sí a través de una línea de tuberías.

Para conseguir la selección de células, se aplica una muestra de aféresis a la primera columna de selección **1**, por lo que los linfocitos T CD8+, si están presentes en la muestra, permanecen unidos a la resina **3** de la primera columna, a medida que las células sin seleccionar (que contienen células CD8-) pasan a través de la columna. El número de células en la muestra inicial utilizada en algunos ejemplos se elige para que sea superior al número de células que han de seleccionarse basándose en el volumen combinado de las matrices, tal como una cantidad superior a la capacidad de la columna para cada selección (por ejemplo, una cantidad que tenga más de 200 millones de células CD8+ y más de 200 millones de células CD4+, por ejemplo, superior en al menos aproximadamente el 10 % o el 20 % o más). El flujo continuo que contiene células sin seleccionar (fracción negativa) pasa después de la primera columna a una segunda columna de selección **2** a través de tuberías acopladas operativamente. Los linfocitos T CD4+ permanecen unidos a la resina **4** en la segunda columna. El flujo que contiene el fluido y otras células sin seleccionar (células negativas) se dirige a un recipiente de residuos **10** a través de válvulas **13** que conectan operativamente la segunda columna de selección y el recipiente de residuos.

En algunas realizaciones, la primera columna de selección puede ser como alternativa una matriz de cromatografía de afinidad anti-CD4 y la segunda columna de selección puede ser una matriz de cromatografía de afinidad anti-CD8.

Desde un depósito **6** de tampón de lavado, se hace pasar un tampón de lavado a través de la primera columna y la segunda columna a través de tuberías acopladas operativamente. El flujo continuo que contiene todas las células lavadas de la primera y la segunda columna se dirige al recipiente de residuos **10** a través de válvulas **13** que conectan operativamente la segunda columna de selección y el recipiente de residuos. En algunas realizaciones, la etapa de lavado se repite preferentemente una pluralidad de veces.

Desde un depósito **7** de tampón de elución, un tampón que contiene un eluyente, tal como concentraciones bajas de biotina o un análogo de la misma, por ejemplo destiobiotina 2,5 mM, se carga para pasar a través de la primera columna y la segunda columna a través de tuberías acopladas operativamente. En algunas realizaciones, el eluyente contiene medio de cultivo celular. El flujo continuo, que contiene células CD4+ y CD8+ enriquecidas y biotina residual o análogo, se dirige a una cámara de extracción **9** para eliminar la biotina o un análogo de la misma. La cámara de extracción **9** es una columna de perlas de Sepharose® Superflow™ que contienen Strep-Tactin® inmovilizada en la misma con un volumen suficiente para eliminar la biotina o un análogo de biotina de la muestra, tal como una columna que tiene un volumen de lecho de 6 ml con una capacidad de unión de 300 nanomoles de biotina/ml. El flujo continuo que contiene células enriquecidas seleccionadas positivamente para CD4+ y CD8+ se dirige a un vaso de cultivo **12**, tal como una bolsa, a través de válvulas que conectan operativamente la cámara de extracción **9** y el vaso de cultivo. En algunas realizaciones, la etapa de elución se repite.

En algunas realizaciones, después de realizar la etapa de elución, un tampón de activación que contiene un reactivo de activación de linfocitos T (por ejemplo, anti-CD3, anti CD28, IL-2, IL-15, IL-7 y/o IL-21) reemplaza el tampón de lavado y se dirige a través de la cámara de extracción y el flujo continuo se dirige al vaso de cultivo. La fracción positiva recogida en el vaso de cultivo es una población celular CD4+ y CD8+ aislada y combinada.

B. Enriquecimiento de una población de linfocitos T CD4+ y una población de linfocitos T CD8+, enriquecidas

en células que expresan un marcador en linfocitos T de memoria central (T_{CM})

En el proceso de ejemplo, representado en la Figura 1B, una serie de columnas de selección inmunocromatográfica y columnas de extracción se disponen en un aparato cerrado **14** conectadas operativamente entre sí y con una bomba peristáltica **8** a través de diversas líneas de tuberías y válvulas **13** para controlar el flujo de la fase líquida.

La primera columna de selección **1** y segunda columna de selección **2** son las mismas que se han descrito anteriormente con respecto al Ejemplo 2A. Además, el proceso incluye además una tercera columna de selección **15** que contiene un volumen elegido de una matriz de afinidad **17**, tal como una resina de agarosa, tal como una resina como se describe en la Solicitud de patente de los EE. UU. N.º US2015/0024411 para el aislamiento de linfocitos T, tal como una como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 2A.

El Fab anti-CD8 y el Fab anti-CD4 se aplican a la primera columna y a la segunda columna, respectivamente, como se describe en el Ejemplo 2A. Un depósito que contiene un fragmento Fab adicional contra un marcador expresado en linfocitos T de memoria central (T_{CM}) **20**, tal como uno de CD28, CD62L, CCR7, CD27 o CD127, se carga para pasar por la bomba **8**, tuberías y válvulas **13** de manera que el Fab adicional se aplica a la tercera columna de selección **15**, por lo que el Fab adicional se conjuga con la Strep-Tactin® en la matriz de afinidad **17** con un Twin Strep-Tag® (SEQ ID NO: 10; IBA GmbH) en el Fragmento Fab, que se fusiona con el extremo carboxiterminal de su cadena pesada, como se describe en el Ejemplo 2A. En algunas realizaciones, un tampón de lavado, como se describe en el Ejemplo 2A, se carga para pasar a través de la tercera columna de selección a través de una tubería acoplada operativamente. El flujo continuo se dirige al recipiente **10** de residuos a través de válvulas **13** que conectan operativamente la tercera columna de selección y el recipiente de residuos. En algunas realizaciones, la etapa de lavado se repite preferentemente una pluralidad de veces.

El volumen del reactivo de matriz de afinidad contenido en la primera selección, las columnas de selección segunda y/o tercera pueden ser iguales o diferentes, y pueden elegirse basándose en el rendimiento deseado de la selección y/o la relación deseada de células CD4+ a células CD8+ enriquecidas en células que expresan un marcador expresado en los linfocitos T de memoria central (T_{CM}) después de la selección. El volumen elegido de este modo se basa en el supuesto de un rendimiento promedio de 1×10^8 células capaces de selección por cada 1 ml de volumen de columna llena. Asimismo, para una relación de inicio de cultivo particular, por ejemplo, una relación de inicio de cultivo de 1:1 de células CD4+ a una población que contiene células CD8+ enriquecidas en un marcador expresado en linfocitos T de memoria central (T_{CM}) (por ejemplo, una población de células CD8+ enriquecida basándose en una selección adicional para uno de entre CD28, CD62L, CCR7, CD27 o CD127), el volumen de la matriz para seleccionar la población parental de la población enriquecida, por ejemplo, las células CD8+, es más grande en comparación con la matriz utilizada para seleccionar la otra población de linfocitos T CD4+ o CD8+, por ejemplo, la población CD4+. La cantidad o extensión en que el volumen de la matriz utilizada para seleccionar la población parental de la población enriquecida adicionalmente, por ejemplo, la matriz que contiene el fragmento Fab anti-CD8, es superior al volumen de la otra matriz u otras matrices y se elige basándose en la fracción o porcentaje de la población de células enriquecida adicionalmente en la muestra (por ejemplo, CD8+/CD28+, CD8+/CD62L+, CD8+/CCR7+, CD8+/CD27+ o CD8+/CD127+) en comparación con la fracción o el porcentaje de la población parental, por ejemplo, células CD8+, presentes en la muestra. Esto puede estimarse basándose en promedios entre pacientes o donantes sanos, o puede medirse para un paciente dado en el que se está realizando la selección antes de determinar el tamaño de las columnas que han de usarse.

En un proceso de ejemplo, los volúmenes de columna utilizados en el proceso son, por ejemplo, una columna de 2 ml con fragmentos Fab anti-CD4, una columna de 6 ml con fragmentos Fab anti-CD8 y una columna de 2 ml con fragmentos Fab anti-CD62L. La longitud de la columna y/o el diámetro de la columna pueden elegirse para adaptarse al volumen deseado, por ejemplo, para conseguir una relación deseada de inicio de cultivo de células CD4+ a células CD8+ enriquecidas en células que expresan un marcador expresado en linfocitos T de memoria central (T_{CM}), por ejemplo, células CD8+/CD28+, CD8+/CD62L+, CD8+/CCR7+, CD8+/CD27+ o CD8+/CD127+. En algunas realizaciones, para acomodar el volumen de la matriz de afinidad, puede añadirse una pluralidad de columnas que tengan inmovilizado en ellas el mismo reactivo de Fab directamente en serie y conectarlas operativamente entre sí a través de una línea de tuberías.

Para conseguir la selección de células, se aplica una muestra de aféresis a la primera columna de selección **1**, por lo que los linfocitos T CD8+, si están presentes en la muestra, permanecen unidos a la resina de la primera columna a medida que las células sin seleccionar (que contienen células CD8-) pasan a través de la columna. El número de células en la muestra de partida utilizada en algunos ejemplos se elige para que sea superior al número de células que han de seleccionarse basándose en el volumen combinado de las matrices, tal como una cantidad superior a la capacidad de la columna para cada selección (por ejemplo, una cantidad que tenga más de 200 millones de células CD8+/CD62L+ y más de 200 millones de células CD4+, por ejemplo, superior en al menos aproximadamente el 10 % o el 20 % o superior). El flujo continuo que contiene células sin seleccionar (fracción negativa) se dirige a la segunda columna **2** a través de una válvula **13** que conectan operativamente la primera y la segunda columna. Los linfocitos T CD4+ permanecen unidos a la resina en la segunda columna. El flujo que contiene el fluido y otras células sin seleccionar (células negativas) se dirige a un recipiente de residuos **10** a través de válvulas **13** que conectan operativamente la segunda columna de selección y el recipiente de fracciones negativas.

Desde un depósito 6 de tampón de lavado, un tampón de lavado, tal como se describe en el Ejemplo 2A, se carga para pasar a través de la primera columna y la segunda columna a través de una válvula y tubos que conectan operativamente las columnas. El flujo continuo que contiene todas las células lavadas de la primera y la segunda columna se dirige al recipiente de residuos 10 a través de válvulas 13 que conectan operativamente la segunda columna de selección y el recipiente de residuos. En algunas realizaciones, la etapa de lavado se repite preferentemente una pluralidad de veces.

Desde un depósito 7 de tampón de elución, un tampón que contiene un eluyente, tal como biotina o un análogo de la misma, por ejemplo destiobiotina 2,5 mM, se carga para pasar a través de la segunda columna 2 a través de válvulas 13 y tuberías que conectan operativamente el depósito de tampón de elución y la segunda columna. En algunas realizaciones, el tampón de elución contiene medio de cultivo celular. El flujo continuo, que contiene células CD4+ enriquecidas y biotina residual, se dirige a una cámara de extracción 9 para eliminar la biotina, tal como se describe en el Ejemplo 2A, que se conecta operativamente a la segunda columna a través de una válvula 13 y tuberías. El flujo continuo que contiene células enriquecidas seleccionadas positivamente para CD4+ se dirige a un vaso de cultivo 12, tal como una bolsa, a través de válvulas 13 que conectan operativamente la cámara de extracción 9 y el vaso de cultivo. En algunas realizaciones, la etapa de elución se repite. En algunas realizaciones, después de realizar la etapa de elución, un tampón de activación que contiene un reactivo de activación de linfocitos T (por ejemplo, anti-CD3, anti CD28, IL-2, IL-15, IL-7 y/o IL-21) reemplaza el tampón de lavado y se dirige a través de válvulas y tuberías desde el depósito del tampón de lavado a la segunda columna, cámara de extracción y dentro del vaso de cultivo. La fracción positiva recogida en el vaso de cultivo es una población aislada de células CD4+.

Desde un depósito 7 de tampón de elución, un tampón que contiene un eluyente, tal como biotina, se carga para ejecutarse a través de la primera columna 1 a través de una válvula 13 y tuberías que conectan operativamente el depósito de tampón de elución y la primera columna. En algunas realizaciones, el tampón de elución contiene medio de cultivo celular. El flujo continuo, que contiene células CD8+ enriquecidas y biotina residual o un análogo de la misma, se dirige a una cámara de extracción 9 para eliminar la biotina o un análogo de biotina, tal como se describe en el Ejemplo 2A, que se conecta operativamente a la primera columna a través de una válvula 13 y tuberías. El flujo continuo que contiene células enriquecidas seleccionadas positivamente para CD8+ se dirige a una tercera columna 15 a través de una válvula 13 que conectan operativamente la cámara de extracción 9 y tercera columna. Un subconjunto CD62L+ de las células CD8+ permanece unido a la resina en la tercera columna. El flujo que contiene el fluido y otras células sin seleccionar (células negativas) se dirige a un segundo recipiente de residuos 11 a través de válvulas 13 que conectan operativamente la tercera columna de selección y el segundo recipiente de residuos.

Desde un depósito 6 de tampón de lavado, un tampón de lavado, tal como se describe en el Ejemplo 2A, se carga para pasar a través de la tercera columna 15 a través de válvulas 13 y tuberías que conectan operativamente el depósito de tampón de lavado y la tercera columna. El flujo que contiene todas las células que se lavan de la tercera columna se dirige al segundo recipiente de residuos 11 a través de válvulas 13 que conectan operativamente la tercera columna de selección y el segundo recipiente de residuos. En algunas realizaciones, la etapa de lavado se repite preferentemente una pluralidad de veces.

Desde un depósito 7 de tampón de elución, un tampón que contiene un eluyente, tal como biotina o un análogo de la misma, por ejemplo destiobiotina 2,5 mM, se carga para pasar a través de la tercera columna 15 a través de una válvula 13 y tuberías que conectan operativamente el depósito de tampón de elución y la tercera columna. En algunas realizaciones, el tampón de elución contiene medio de cultivo celular. El flujo continuo, que contiene células CD8+ enriquecidas en linfocitos T de memoria central (T_{CM}) que expresan uno de CD28, CD62L, CCR7, CD27 o CD127, y biotina residual o análogo de la misma, se dirige a una cámara de extracción 9 para eliminar la biotina o un análogo de biotina, tal como se describe en el Ejemplo 2A, que se conecta operativamente a la tercera columna a través de una válvula 13 y tuberías. El flujo continuo que contiene células de memoria de linfocitos T enriquecidas seleccionadas positivamente para CD8 y un marcador expresado en linfocitos T de memoria central (T_{CM}), tal como uno de CD28, CD62L, CCR7, CD27 o CD127, se dirige al vaso de cultivo 12, tal como una bolsa, a través de válvulas 13 que conectan operativamente la cámara de extracción 9 y el vaso de cultivo. En algunas realizaciones, el vaso de cultivo contiene un reactivo de activación de linfocitos T, un medio de cultivo celular o ambos. En algunas realizaciones, la etapa de elución se repite. En algunas realizaciones, después de realizar la etapa de elución, un tampón de activación que contiene un reactivo de activación de linfocitos T (por ejemplo, anti-CD3, anti CD28, IL-2, IL-15, IL-7 y/o IL-21) reemplaza el tampón de lavado y se dirige a través de válvulas y tuberías desde el depósito del tampón de lavado a la primera y/o tercera columna, cámara de extracción y dentro del vaso de cultivo. La fracción positiva que contiene células CD8+ y células positivas para un marcador en linfocitos T de memoria central (T_{CM}), tal como uno de CD28, CD62L, CCR7, CD27 o CD127, se recoge en el vaso de cultivo con la fracción positiva para CD4+ recogida anteriormente. En algunas realizaciones, las etapas del proceso pueden realizarse en un orden diferente, tal como enriqueciendo en primer lugar en células que contienen células CD8+ y células positivas para un marcador en linfocitos T de memoria central (T_{CM}), tal como uno de CD28, CD62L, CCR7, CD27 o CD127 antes de enriquecer células CD4+.

Ejemplo 3: Generación de una composición de linfocitos T CD4+ y CD8+ mediante purificación secuencial en un sistema cerrado para su uso en ingeniería genética y terapia celular adoptiva

Este ejemplo demuestra un procedimiento para seleccionar y generar una composición de células que contienen linfocitos T CD4+ y CD8+, tales como linfocitos T CD4+ y CD8+ presentes en una relación de inicio de cultivo, para la incubación/activación y transducción en métodos asociados a ingeniería genética de células para su uso en conexión con terapia celular adoptiva.

5 Una composición de células generada mediante selección de células CD4+ y CD8+, realizadas como se describe en el Ejemplo 2A (CD4+ y CD8+) o en el Ejemplo 2B (CD4+ y CD8+ enriquecidas en CD62L+), se incuban en condiciones estimuladoras, tal como usando anti-CD3/anti-CD28 en presencia de IL-2 (100 UI/ml), por ejemplo, durante 72 horas a 37 °C. Después, las células estimuladas se modifican genéticamente introduciendo en las células genes
10 recombinantes para la expresión de receptores de antígenos recombinantes, tales como receptores de antígenos quiméricos (CAR) o TCR recombinantes, por ejemplo, mediante transducción vírica. En algunas realizaciones, después de la introducción, las células se incuban adicionalmente, generalmente a 37 grados C, por ejemplo, para permitir la expansión celular.

15 El método da como resultado una composición de salida con linfocitos T CD4+ y CD8+ modificados por ingeniería. En algunas realizaciones, basándose en el volumen elegido de las columnas de selección, la relación de células CD4+ a CD8+ en la composición que se incuban en las condiciones estimuladoras antes de la modificación por ingeniería (relación de inicio de cultivo) da como resultado una relación de salida deseada particular de células CD4+ a CD8+ o de células CD4+ modificadas por ingeniería a células CD8+ modificadas por ingeniería, o una relación de este tipo
20 que esté dentro de un determinado intervalo de error tolerado de una relación de salida deseada de este tipo, después de las etapas de incubación, estimulación y/o modificación por ingeniería. En algunas realizaciones, una relación de salida deseada de este tipo o una relación dentro del intervalo de error tolerado un determinado porcentaje tolerado del tiempo.

25 **Ejemplo 4: Selección de células usando concentraciones de rendimiento subóptimas de superficies recubiertas con Fab**

Se incubaron muestras de PBPC derivadas de aféresis humana, en un intervalo de diferentes números de células, en una única composición con microperlas magnéticas conjugadas con Fab anti-CD4 y microperlas magnéticas
30 conjugadas con Fab anti-CD8, con mezcla suave durante aproximadamente 30 minutos. A esta incubación le siguió la elución de células sin seleccionar y la recuperación usando campo magnético realizada como se ha descrito anteriormente. La incubación usando entre 0,05 y 1,5 ml de cada reactivo de microperlas por millón de células produjo rendimientos bajos de células CD4+ o CD8+, respectivamente (células recuperadas para la respectiva selección en comparación con las células positivas en la incubación), que en este estudio generalmente estaban en el intervalo del
35 15-70 %). En promedio, se observaron mayores rendimientos a concentraciones más altas de reactivos por célula usando concentraciones de rendimiento subóptimas.

En consecuencia, en un ejemplo, se realiza una selección, en la que las PBMC se incuban con concentraciones subóptimas por número de células de perlas acopladas a un agente de unión a CD4 y perlas acopladas a un agente
40 de unión a CD8, y las células se recuperan usando un campo magnético. Basándose en la relación observada entre la concentración del reactivo por célula y el rendimiento de las perlas utilizadas, uno u otro de entre el reactivo de unión a CD4 o de unión a CD8 se incluye en una concentración más alta (por ejemplo, mayor número de moléculas de unión a Cd4 o CD8 incluidas por célula), produciendo de este modo una relación de salida de células CD8+: CD4+ después de la selección, que es superior o inferior a 1, tal como 1,5:1 o 2:1 o 3:1 o 1:1,5, 1:2 o 1:3. La relación de
45 salida puede seleccionarse basándose en la relación deseada de células CD8 frente a CD4 en una composición que contiene células modificadas por ingeniería que han de producirse después de una o más etapas adicionales, tales como activación, transducción y/o expansión.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una dosis de linfocitos T CD4+ y CD8+ modificados genéticamente para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria en un sujeto, en donde:

- (i) los linfocitos T CD4+ y CD8+ están en una relación entre 5:1 y 1:5;
- (ii) la dosis de linfocitos T CD4+ y CD8+ está entre 1×10^6 y 1×10^{11} células;
- (iii) los linfocitos T CD4+ y CD8+ se modificaron por ingeniería genética con un receptor de antígenos quimérico (CAR), en donde el CAR:

(a) reconoce un antígeno expresado por células de la enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria, en donde el antígeno es CD19;

(b) comprende un dominio de reconocimiento de antígeno extracelular y un dominio de señalización intracelular que comprende una secuencia que contiene ITAM y un dominio de señalización intracelular de una molécula coestimuladora de linfocitos T; y

- (iv) los linfocitos T CD4+ y CD8+ son de una muestra obtenida del sujeto con la enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria.

2. La composición para el uso de la reivindicación 1, en donde los linfocitos T CD4+ y CD8+ están en una relación entre 1:3 y 3:1.

3. La composición para el uso de la reivindicación 1, en donde los linfocitos T CD4+ y CD8+ están en una relación entre 2:1 y 1:5.

4. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la dosis de linfocitos T CD4+ y CD8+ está entre 1×10^6 y 1×10^9 células.

5. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la dosis de linfocitos T CD4+ y CD8+ está entre 1×10^6 y 25×10^6 células.

6. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la dosis de linfocitos T CD4+ y CD8+ es de 5×10^6 células.

7. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la dosis de linfocitos T CD4+ y CD8+ es de 10×10^6 células.

8. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la dosis de linfocitos T CD4+ y CD8+ es de 20×10^6 células.

9. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la muestra es una muestra de sangre o derivada de sangre, opcionalmente en donde la muestra es una muestra de glóbulos blancos, una muestra de aféresis, una muestra de leucocitaféresis, una muestra de células mononucleares de sangre periférica y sangre completa.

10. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la muestra deriva de un producto de aféresis o de leucocitaféresis.

11. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en artritis, diabetes de tipo I, lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, esclerodermia, enfermedad tiroidea autoinmunitaria, enfermedad de Grave, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, asma y una enfermedad o afección asociada al trasplante.

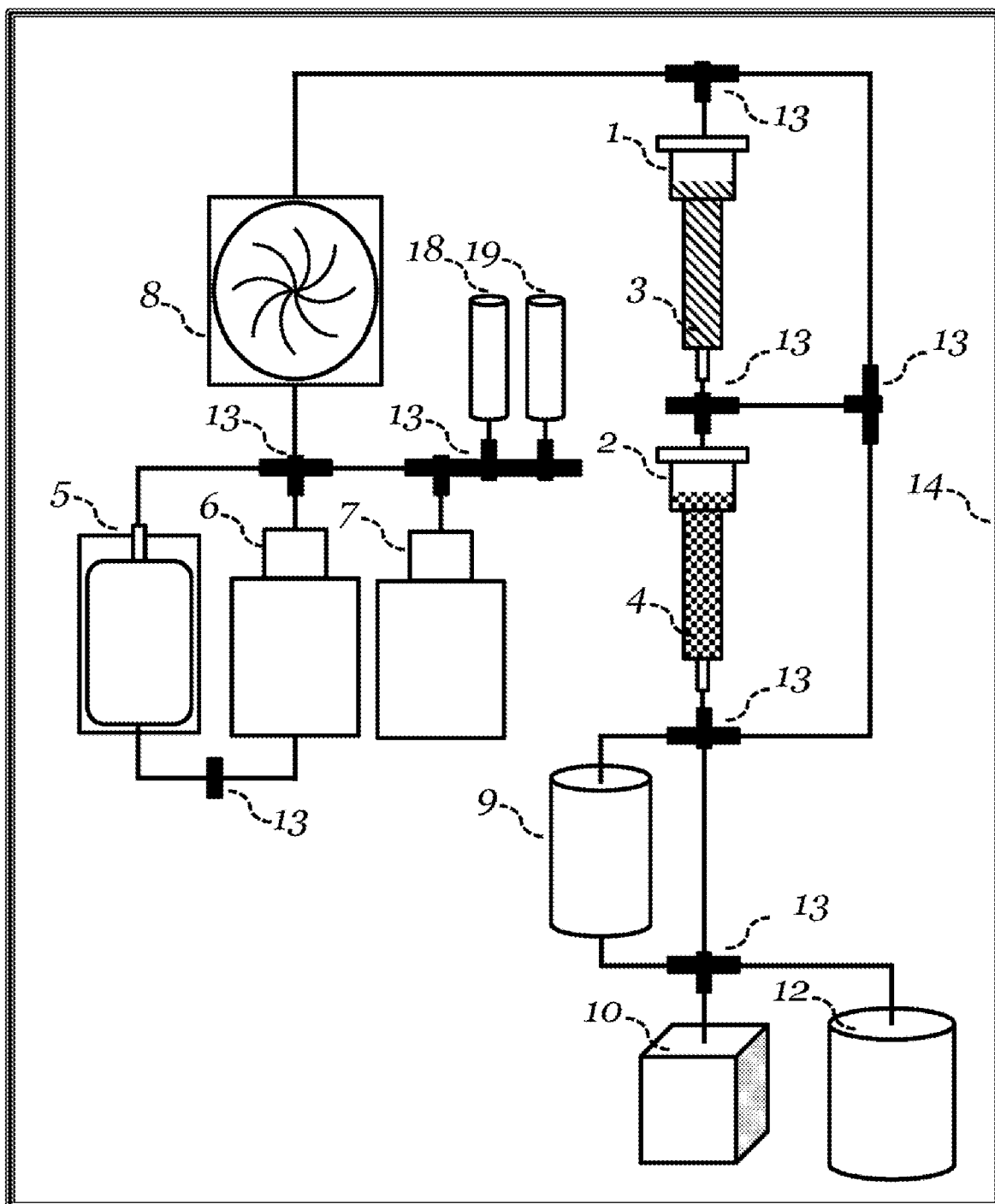
12. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde la enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria es LES.

13. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el CAR comprende un fragmento de anticuerpo monocatenario (scFV) que se une a CD19.

14. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde el dominio de señalización celular intracelular deriva de CD3zeta.

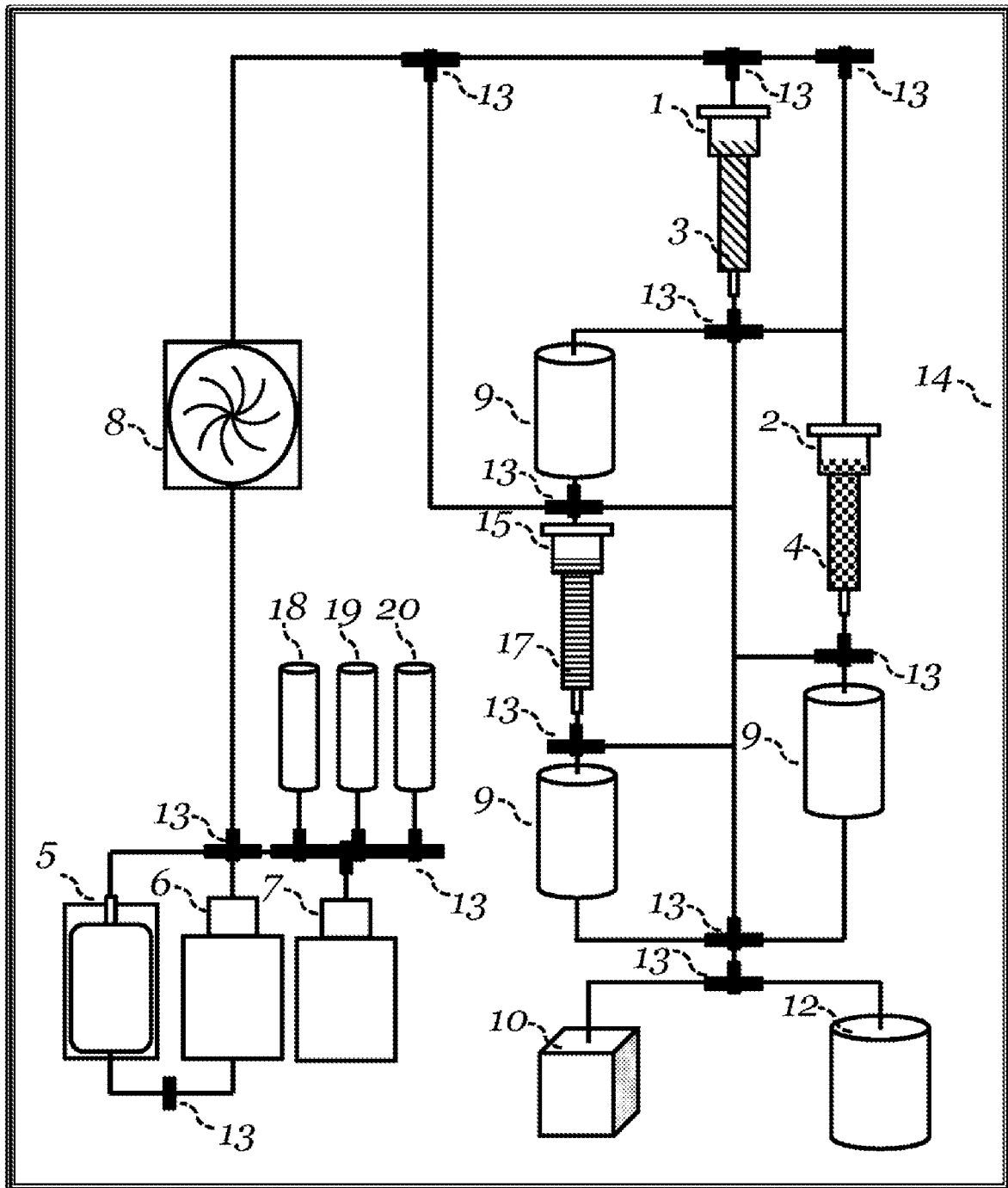
15. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde el CAR incluye un dominio de señalización y/o una porción transmembrana de un receptor coestimulador, opcionalmente seleccionado de CD28, 4-1BB, OX40, DAP10 e ICOS.

FIGURA 1A



Tubería ———

FIGURA 1B



Tubería ———