

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 988 795**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

C07K 14/725 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.02.2018** **PCT/US2018/020054**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.08.2018** **WO18157171**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2018** **E 18710284 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2024** **EP 3585402**

54 Título: **Composiciones, artículos de fabricación y métodos relacionados con la dosificación en terapia celular**

30 Prioridad:

27.02.2017 US 201762464371 P
01.03.2017 US 201762465817 P
10.03.2017 US 201762470180 P
29.06.2017 US 201762527002 P
01.11.2017 US 201762580416 P
10.11.2017 US 201762584740 P
08.12.2017 US 201762596703 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.11.2024

73 Titular/es:

JUNO THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
400 Dexter Ave. N Suite 1200
Seattle, WA 98109-4703, US

72 Inventor/es:

CHRISTIN, BRIAN;
COVINGTON, MICHAEL GERARD;
DAVE, KEDAR HIMANSHU;
GETTO, RICHARD JAMES, JR.;
KOWSKI, TOM;
LARSON, RYAN P.;
RAMSBORG, CHRISTOPHER GLEN;
TREDE, NIKOLAUS SEBASTIAN;
WEBER, CLINTON;
WHITMORE, JAMES BOYD;
YEE, NATHAN;
BEAUCHESNE, PASCAL;
BECKETT, TRAVIS;
BLACKMAN, SAMUEL CHARLES;
CHARTRAND, NATHANIEL;
DAVIS-PICKETT, MEL;
GILBERT, MARK;
LAMBERT, NATHANIEL;
LI, HE;
MALLANEY, MARY;
POLLOCK, KATHRYN LINDSAY;
ODEGARD, VALERIE;
SMITH, JEFF;
SUTHERLAND, CLAIRE y

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).

ES 2 988 795 T3

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 988 795**

72 Inventor/es:

WALKER, ANDREW W.

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

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

ES 2 988 795 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

Composiciones, artículos de fabricación y métodos relacionados con la dosificación en terapia celular

5 Campo

10 **[0001]** La presente divulgación se refiere a la terapia celular que implica la administración de una o más dosis de una composición terapéutica de células T, y a métodos, composiciones y artículos de fabricación para su uso en la misma. Las células de la composición de células T expresan receptores recombinantes como receptores quiméricos, por ejemplo, receptores de antígenos quiméricos (CAR) u otros receptores transgénicos como receptores de células T (TCR). Las características de las realizaciones de la presente divulgación, incluyendo el número de células o unidades de células administradas y/o la potencia de las células administradas, proporcionan diversas ventajas, como un menor riesgo de toxicidad en los sujetos a los que se administran las composiciones de células T.

15 Fondo

20 **[0002]** Existen varios métodos de terapia celular para tratar enfermedades y afecciones. Se necesitan métodos mejorados, por ejemplo, para reducir el riesgo de toxicidad de dichos métodos. Por ejemplo, se necesitan métodos mejorados para reducir el riesgo de toxicidad de las terapias celulares, manteniendo al mismo tiempo la eficacia de las células administradas en el sujeto. Se proporcionan composiciones, artículos de fabricación, métodos y usos que satisfacen tales necesidades.

25 **[0003]** El documento WO2016064929A1 describe métodos y composiciones para la dosificación en terapia celular adoptiva. Klaver Yarne et al, Immunotherapy (2015), vol. 7, n.º 5, páginas 513-533, describe la necesidad de una monitorización inmunitaria estándar en la terapia de células T adoptivas.

Resumen

30 **[0004]** La invención proporciona un método para determinar si un sujeto está en riesgo de toxicidad, que comprende ensayar el número de células que expresan receptores recombinantes en una muestra de sangre de un sujeto, habiéndosele administrado previamente al sujeto una dosis de las células que expresan receptores recombinantes, en el que el sujeto está en riesgo de desarrollar una toxicidad si:

- 35 (i) no más de cuatro días después del inicio de la administración, el número de células que expresan receptores recombinantes en la muestra de sangre del sujeto es de al menos 2 células que expresan receptores recombinantes por microlitro;
- 40 (ii) no más de cinco o seis días después del inicio de la administración, el número de células que expresan receptores recombinantes en la muestra de sangre del sujeto es de al menos 5 células que expresan receptores recombinantes por microlitro o es de al menos 10 células que expresan receptores recombinantes por microlitro; o bien
- (iii) no más de siete días después del inicio de la administración, el número de células que expresan receptores recombinantes en la muestra de sangre del sujeto es de al menos 15 células que expresan receptores recombinantes por microlitro.

45 **[0005]** La invención proporciona además una dosis de células que expresan un receptor recombinante para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o afección y determinar si el sujeto está en riesgo de toxicidad, en el que el método comprende:

- 50 (a) administrar a un sujeto que padece una enfermedad o afección la dosis de células que expresan un receptor recombinante; y
- (b) después de administrar las células, analizar el número de células que expresan receptores recombinantes en una muestra de sangre del sujeto para determinar si el sujeto está en riesgo de desarrollar una toxicidad, donde el sujeto está en riesgo de desarrollar una toxicidad si:

- 55 (i) no más de cuatro días después del inicio de la administración, el número de células que expresan receptores recombinantes en la muestra de sangre del sujeto es de al menos 2 células que expresan receptores recombinantes por microlitro;
- 60 (ii) no más de cinco o seis días después del inicio de la administración, el número de células expresantes de receptores de recombinantes en la muestra de sangre del sujeto es de al menos 5 células expresantes de receptores de recombinantes por microlitro o es de al menos 10 células expresantes de receptores de recombinantes por microlitro; o bien
- (iii) no más de siete días después del inicio de la administración, el número de células que expresan receptores recombinantes en la muestra de sangre del sujeto es de al menos 15 células que expresan receptores recombinantes por microlitro.

65 **[0006]** En algunos aspectos, el riesgo de desarrollar un efecto secundario adverso tras la administración de la composición

terapéutica de células T a un sujeto es mayor o se produce con mayor incidencia en determinados sujetos que presentan uno o más factores de riesgo, como en (i) sujetos que han recibido menos terapias previas, opcionalmente menos de dos terapias previas, antes del inicio de la administración de la composición terapéutica de células T, (ii) sujetos de edad joven, opcionalmente menos de 30 años, (iii) sujetos en los que la relación CD4:CD8 en una muestra de aféresis del sujeto es inferior a un determinado umbral, opcionalmente inferior a 1: 1 o por debajo de 1,5: 1 o inferior a 0,5: 1 o inferior, como cuando la dosis administrada se basa en el total de células T o en el total de células T que expresan un receptor de ingeniería o recombinante como un CAR, p. ej., sin especificar el número o la proporción de células T CD4+ o CD8+ en la dosis; (iv) sujetos con un peso superior al peso medio entre el grupo de sujetos tratados; (v) sujetos con un recuento de plaquetas inferior o aproximadamente inferior a 120.000; (vi) sujetos con una leucemia de células B, opcionalmente leucemia linfocítica aguda (ALL); (vii) sujetos que presentan una carga de enfermedad elevada antes de, por ejemplo, inmediatamente antes de o en el plazo de un mes antes de, iniciar la administración de la composición terapéutica de células T, opcionalmente según se determine en función del porcentaje de blastos de médula ósea mayor o igual al 5%, la suma del diámetro del producto (SPD) o los niveles de lactato deshidrogenasa; o (viii) sujetos que no presenten un cromosoma Filadelfia (Ph+) y/o un subtipo molecular similar al cromosoma Ph (similar a Ph) de leucemia linfoblástica aguda (ALL); (ix) sujetos que hayan recibido una quimioterapia puente antes del inicio de la administración de la composición terapéutica de células T; (x) sujetos que han sido preacondicionados con una terapia de linfodepleción, que opcionalmente comprende la administración de fludarabina y/o ciclofosfamida, antes del inicio de la administración de la composición celular T terapéutica; y/o (xi) sujetos en los que el nivel, cantidad o concentración de interleucina-15 (IL-15) en una muestra de sangre antes del inicio de la administración de la composición celular T terapéutica es superior a un valor umbral. En algunas realizaciones, los métodos y las dosis de uso proporcionados tienen en cuenta dichos atributos o propiedades, como en relación con la dosificación de un sujeto, y de ese modo previenen, mejoran o reducen el riesgo o la probabilidad de que un sujeto desarrolle un acontecimiento adverso o toxicidad, como neurotoxicidad grave o neurotoxicidad de grado 3 o superior o prolongada de grado 3, grado 4 o grado 5, tras la administración de la composición de células T terapéuticas.

[0007] En algunas de dichas realizaciones, una combinación de atributos o parámetros de la composición de células CAR-T terapéuticas (p. ej., actividad específica del antígeno y/o viabilidad), factores y/o características del sujeto (p. ej., edad, peso y/o enfermedad) y otros tratamientos (p. ej., número de tratamientos previos) se asocian con el riesgo de desarrollar neurotoxicidad mortal, p. ej., tras el tratamiento con una composición de células CAR-T.

[0008] En algunas de tales realizaciones, el edema cerebral está correlacionado y/o asociado con expansiones tempranas y rápidas de células CAR T y/o con un aumento del nivel de IL-15, un biomarcador de inflamación y factor de crecimiento CAR-T. En algunos aspectos, la dosis y la función de las células CD8+ CAR+, junto con las características y/o factores del sujeto, impulsan, se correlacionan y/o se asocian con la expansión temprana y/o rápida de las células CAR-T.

[0009] En algunas de tales realizaciones, las características y/o factores del sujeto son o incluyen edad joven (por ejemplo, menos de 30 años de edad), tratamiento previo (por ejemplo, con dos o menos regímenes previos), quimioterapia puente intensiva, y/o el uso de fludarabina/ciclofosfamida de alta intensidad, como para linfodepleción.

[0010] En algunas de tales realizaciones, el edema cerebral, por ejemplo, el edema cerebral asociado con y/o después de la terapia celular CAR-T, se asocia con daño endotelial y ruptura completa de la barrera hematoencefálica (BBB). En ciertos aspectos, el edema cerebral no está asociado con la infiltración de células CAR T en el cerebro, la leucemia del sistema nervioso central (SNC) o terapias previas contra la leucemia del SNC.

[0011] En algunas de tales realizaciones, la identificación de pacientes de alto riesgo antes o con anterioridad al tratamiento, por ejemplo, con una terapia celular CAR-T, es clave para gestionar y mitigar potencialmente el riesgo, por ejemplo, el riesgo o la probabilidad de toxicidad como neurotoxicidad o edema cerebral.

[0012] En ciertas realizaciones, la enfermedad o afección es un cáncer, opcionalmente un mieloma, linfoma o leucemia. En determinadas realizaciones, la enfermedad o afección es una neoplasia maligna de células B, opcionalmente una neoplasia maligna de células B se selecciona del grupo que consiste en leucemia linfoblástica aguda (ALL), ALL en adultos, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma no Hodgkin (NHL) y linfoma difuso de grandes células B (DLBCL). En algunas realizaciones, el antígeno es integrina $\alpha\text{v}\beta 6$ (integrina $\alpha\text{v}\beta 6$), el antígeno de maduración de células B (BCMA), B7-H3, B7-H6, la anhidrasa carbónica 1 (CA9, también conocida como CAIX o G250), un antígeno cancerígeno-testicular, antígeno cancerígeno/testicular 1B (CTAG, también conocido como NY-ESO-2 y LAGE-1), antígeno carcinoembrionario (CEA), una ciclina, ciclina A2, Líquido Quimiotáctico de Motivo C-C 1 (CCL-8), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/2, CD123, CD138, CD171, proteína del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), proteína del factor de crecimiento epidérmico truncada (EGFR), mutación del receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo III (EGFR vIII), glicoproteína epitelial 2 (EPG-40), glicoproteína epitelial 40 (EPG-5), efrinaB2, receptor de efrina A2 (EPHa2), receptor de estrógeno, receptor similar al receptor Fc 5 (FCRL5; también conocido como homólogo 100 del receptor Fc o FCRH5), receptor de acetilcolina fetal (AChR fetal), unión a folato (FBP), receptor de folato alfa, gangliósido GD2, GD2 O-acetilado (OGD2), gangliósido GD3, glicoproteína 22 (gp100), receptor acoplado a proteína G 5D (GPCR5D), Her2/neu (receptor tirosina quinasa erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), dímeros de erbB, antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular humano (HMW-MAA), antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, antígeno leucocitario humano A1 (HLA-A1), antígeno leucocitario humano A2 (HLA-A2), receptor alfa de IL-13 (IL-22Ra), IL-2 receptor alfa 8 (IL-13Ra2), receptor del dominio de inserción de quinasa (kdr), cadena ligera kappa, molécula de

adhesión celular L1 (L1-CAM), epitopo CE7 de L1-CAM, miembro A de la familia 1 que contiene repeticiones ricas en leucina (LRRC8A), Lewis Y, antígeno asociado a melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, mesotelina, c-Met, citomegalovirus murino (CMV), mucina 2 (MUC1), MUC16, ligandos del receptor D del grupo 1 de células asesinas naturales (NKG2D), melan A (MART-1), molécula de adhesión de células nerviosas (NCAM), antígeno oncofetal, antígeno preferencialmente expresado en melanoma (PRAME), receptor de progesterona, un antígeno específico de próstata, antígeno de células madre de próstata (PSCA), antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), receptor tirosina quinasa similar a receptor huérfano 72 (ROR1), survivina, glicoproteína trofoblástica (TPBG también conocida como 5T4), glicoproteína asociada a tumores 2 (TAG72), receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2), tumor 1 de Wilms (WT-1), un antígeno específico de patógeno o un antígeno asociado con una marcación universal, y/o moléculas biotiniladas, y/o moléculas expresadas por HIV, HCV, HBV u otros patógenos. Los antígenos a los que se dirigen los receptores en algunas realizaciones incluyen antígenos asociados con una neoplasia de células B, como cualquiera de un número de marcadores de células B conocidos. En algunas realizaciones, el antígeno es o incluye CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Igkappa, Iglambda, CD79a, CD79b o CD30.

[0013] En algunas realizaciones, la muestra de sangre es o comprende una muestra de sangre total, una muestra de capa leucocitaria, una muestra de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), una muestra de células T no fraccionadas, una muestra de linfocitos, una muestra de glóbulos blancos, un producto de aféresis o un producto de leucaféresis.

Breve Descripción de los Dibujos

[0014]

La FIG. 1 muestra un gráfico que muestra las concentraciones de células CAR+/ μ L de sangre en diferentes puntos temporales tras la administración de composiciones de células T que contienen células que expresan CAR anti-CD19. Se muestran los datos de los sujetos que desarrollaron neurotoxicidad de grado 3 o inferior (estrellas), de grado 4 (pentágono) o de grado 5 (círculos).

La FIG. 2 muestra un gráfico que muestra las concentraciones de células CAR+/ μ L de sangre en diferentes puntos temporales tras la administración de composiciones de células T que contienen células que expresan CAR anti-CD19. Se muestran los datos de los sujetos que desarrollaron neurotoxicidad de grado 2 o inferior (cuadrados), de grado 3 (estrellas), de grado 3 prolongado (rombo), de grado 4 (pentágono) o de grado 5 (círculos con flecha).

Las FIGS. 3A a 3V muestran gráficos de caja que cuantifican diferentes parámetros de composiciones celulares que contienen células que expresan un CAR anti-CD19. Los gráficos de caja de la izquierda comparan las mediciones de las composiciones celulares derivadas de sujetos que desarrollaron neurotoxicidad de grado 4 o inferior con las mediciones de las composiciones celulares derivadas de sujetos que desarrollaron neurotoxicidad de grado 5. Los gráficos de caja de la derecha comparan las mediciones de las composiciones celulares derivadas de los sujetos que experimentaron una respuesta completa (CR) con las mediciones de las composiciones celulares derivadas de los sujetos que no experimentaron ninguna respuesta (NR). Las mediciones de las composiciones celulares derivadas de sujetos cuya respuesta no está disponible también se muestran en este gráfico (NA).

Los gráficos de caja de FIG. 3A muestran las mediciones del número total de células CD8+CAR+apoptóticas marcador-negativas administradas a los sujetos.

Los gráficos de caja de FIG. 3B muestran el porcentaje de células CD8+CAR+ positivas para IL-13 tras PMA/ionomicina mediante tinción interna de citoquinas (ICS) en las dosis administradas.

Los gráficos de caja de FIG. 3C muestran el número/kg de células CD8+CAR+ con marcador apoptótico (Anexina V-) negativo administradas.

Los gráficos de caja de FIG. 3D muestran el porcentaje de células CD4+CAR+ positivas para CD127+.

Los gráficos de caja de FIG. 3E muestran el número total de células infundidas/kg.

Los gráficos de caja de FIG. 3F muestran el porcentaje de células CD4+CAR+ positivas para IL-13 tras PMA/ionomicina por ICS.

Los gráficos de caja de FIG. 3G muestran la frecuencia de células positivas al marcador apoptótico (Anexina V) entre las células CD8+CAR+ administradas.

Los gráficos de caja de FIG. 3H muestran los niveles de FOXP3 por QPCR.

Los gráficos de caja de FIG. 3I muestran el número total de células CD3+CAR+marcador apoptótico (Anexina V)-negativas administradas.

Los gráficos de caja de FIG. 3J muestran el número/kg de células CD3+CAR+ con marcador apoptótico (Anexina V)-negativo administradas.

Los gráficos de caja de FIG. 3K muestran la concentración de células viables del producto farmacológico crioconservado (CDP).

Los gráficos de caja de FIG. 3L muestran el total de células infundidas.

Los gráficos de caja de FIG. 3M muestran ICS de IL2 en células CD4+CAR+.

Los gráficos de caja de FIG. 3N muestran la frecuencia de células positivas al marcador apoptótico (Anexina V) entre las células CD3+CAR+ administradas.

Los gráficos de caja de FIG. 3O muestran la frecuencia de células FOXP3+ por células CD4+.

Los gráficos de caja de FIG. 3P muestran la frecuencia de células CD3+.

Los gráficos de caja de FIG. 3Q muestran el número/kg de células CD8+CAR+ administradas.

Los gráficos de caja de FIG. 3R muestran la producción de IL-10 no específica de antígeno/CAR por célula total (CD3/28 stim).

Los gráficos de caja de FIG. 3S muestran ICS de TNF alfa de células CD4+CAR+.

Los gráficos de caja de FIG. 3T muestran ICS de TNF alfa de células CD8+CAR+.

Los gráficos de caja de FIG. 3U muestran la producción de IL-6 no específica de antígeno/CAR por célula total (CD3/28 stim).

Los gráficos de caja de FIG. 3V muestran el número de células CD3+CAR+ administradas / kg.

La FIG. 4 muestra gráficos de caja que cuantifican la producción de TNF-alfa tras el estímulo con CD19 por composiciones celulares que contienen células que expresan un CAR anti-CD19. El gráfico de cajas de la izquierda compara las mediciones de las composiciones celulares derivadas de sujetos que desarrollaron neurotoxicidad de grado 4 o inferior con las mediciones de las composiciones celulares derivadas de sujetos que desarrollaron neurotoxicidad de grado 5. Los gráficos de caja de la derecha comparan las mediciones de las composiciones celulares derivadas de los sujetos que experimentaron una CR con las mediciones de las composiciones celulares derivadas de los sujetos que experimentaron una RN. Las mediciones de las composiciones celulares derivadas de sujetos cuya respuesta no está disponible también se muestran en este gráfico (NA).

Las FIGS. 5A-B muestran gráficos de caja que cuantifican la producción de citocinas tras el estímulo con CD19 por composiciones celulares que contienen células que expresan un CAR anti-CD19. El gráfico de cajas de la izquierda compara las mediciones de las composiciones celulares derivadas de sujetos que desarrollaron neurotoxicidad de grado 4 o inferior con las mediciones de las composiciones celulares derivadas de sujetos que desarrollaron neurotoxicidad de grado 5. Los gráficos de caja de la derecha comparan las mediciones de las composiciones celulares derivadas de los sujetos que experimentaron una CR con las mediciones de las composiciones celulares derivadas de los sujetos que experimentaron una RN. Las mediciones de las composiciones celulares derivadas de sujetos cuya respuesta no está disponible también se muestran en este gráfico (NA).

Los gráficos de caja de FIG. 5A muestran la producción de IL-2 estimulada por el antígeno.

Los gráficos de caja de FIG. 5B muestran la producción de IFN gamma estimulada por el antígeno.

Las FIGS. 6A y 6B muestran gráficos de dispersión bidimensionales del número de células CD8+CAR+ con marcador de apoptosis (Anexina V-) en la dosis administrada y la producción de TNF alfa estimulada por antígeno. En la FIG. se muestran puntos de datos de composiciones celulares derivadas de sujetos que desarrollaron neurotoxicidad de grado 4 o inferior (círculos) o de grado 5 (triángulos). 6A; Los puntos de datos de composiciones celulares derivadas de sujetos que desarrollaron neurotoxicidad de grado 0-2, 3, prolongada 3 (3p), 4 y 5 se muestran en la FIG. 6B. En FIG. 6B, se muestran los puntos de datos asociados a los sujetos que desarrollaron neurotoxicidad de grado 5 y recibieron quimioterapia linfodepletor con ciclofosfamida (CY) o fludarabina y ciclofosfamida (Flu/CY). El óvalo indica el intervalo de estos parámetros para una mayoría de 11 composiciones celulares ejemplares evaluadas a partir de un estudio clínico en el que ningún sujeto presentó neurotoxicidad de grado 5 ni edema cerebral.

La FIG. 7 muestra un gráfico de dispersión bidimensional del número de células CD8+CAR+ con marcador de apoptosis (Anexina V-) en la dosis administrada y la producción de TNF alfa estimulada por el antígeno. Se muestran puntos de datos de composiciones celulares derivadas de sujetos que desarrollaron neurotoxicidad de grado 4 o inferior (cuadrados y círculos) o de grado 5 (triángulos). Se muestran las composiciones celulares derivadas de sujetos de un estudio clínico adicional (cuadrados).

La FIG. 8 muestra un gráfico con puntos de datos individuales del número de células CD8+CAR+ con marcador de apoptosis (Anexina V) administradas x producción de TNF-alfa en sujetos que desarrollaron diferentes grados de neurotoxicidad.

La FIG. 9 muestra un gráfico con puntos de datos individuales del número de células CD8+CAR+ con marcador de apoptosis (Anexina V-) administradas x producción de TNF-alfa para sujetos con diferentes respuestas.

La FIG. 10 muestra un gráfico con puntos de datos individuales del número de células CD8+CAR+ con marcador de apoptosis (Anexina V-) administradas x producción de IFN gamma en sujetos que desarrollaron diferentes grados de neurotoxicidad.

La FIG. 11 muestra un gráfico con puntos de datos individuales del número de células CD8+CAR+ con marcador de apoptosis (Anexina V-) administradas x producción de IFN gamma para sujetos con diferentes respuestas clínicas.

La FIG. 12 muestra un gráfico con puntos de datos individuales del número de células CD8+CAR+ con marcador de apoptosis (Anexina V-) administradas x producción de IL-2 en sujetos que desarrollaron diferentes grados de neurotoxicidad.

La FIG. 13 muestra un gráfico con puntos de datos individuales del número de células CD8+CAR+ con marcador de apoptosis (Anexina V-) administradas x producción de IL-2 para sujetos con diferentes respuestas clínicas.

Las FIGS. 14A y 14B muestran gráficos que muestran puntos de datos individuales del número de células CD8+CAR+ con marcador de apoptosis (Anexina V-) administradas (A) x producción normalizada de TNF-alfa (B) para sujetos que desarrollaron diferentes grados de neurotoxicidad (FIG. 14A) o para sujetos con respuestas diferentes (FIG. 14B).

Las FIGS. 15A y 15B muestran un gráfico con puntos de datos individuales del número de células CD8+CAR+ con marcador de apoptosis (Anexina V-) administradas (A) x producción normalizada de IFN-gamma (B) para sujetos que desarrollaron diferentes grados de neurotoxicidad (FIG. 15A) o para sujetos con respuestas diferentes (FIG. 15B).

Las FIGS. 16A y 16B muestran un gráfico con puntos de datos individuales del número de células CD8+CAR+ con marcador de apoptosis (Anexina V-) administradas (A) x producción normalizada de IL-2 (B) para sujetos que desarrollaron diferentes grados de neurotoxicidad (FIG. 16A) o para sujetos con respuestas diferentes (FIG. 16B).

Las FIGS. 17A y 17B muestran un gráfico con puntos de datos individuales del número de células CD8+CAR+ con marcador de apoptosis (Anexina V) administradas (A) x producción normalizada de TNF alfa e IFN gamma (B) en sujetos que desarrollaron diferentes grados de neurotoxicidad (FIG. 17A) o para sujetos con respuestas diferentes (FIG. 17B).

Las FIGS. 18A y 18B muestran un gráfico con puntos de datos individuales del número de células CD8+CAR+ con marcador de apoptosis (Anexina V-) administradas (A) x producción normalizada de TNF alfa e IL-2 (B) para sujetos que desarrollaron diferentes grados de neurotoxicidad (FIG. 18A) o para sujetos con respuestas diferentes (FIG. 18B).

Las FIGS. 19A y 19B muestran un gráfico con puntos de datos individuales del número de células CD8+CAR+ con marcador de apoptosis (Anexina-) administradas (A) x producción normalizada de IFN gamma e IL-2 (B) para sujetos que desarrollaron diferentes grados de neurotoxicidad (FIG. 19A) o para sujetos con respuestas diferentes (FIG. 19B).

Las FIGS. 20A y 20B muestran un gráfico con puntos de datos individuales del número de células CD8+CAR+ con marcador de apoptosis (Anexina-) administradas (A) x producción normalizada de TNF alfa, IFN gamma e IL-2 (B) para sujetos que desarrollaron diferentes grados de neurotoxicidad (FIG. 20A) o para sujetos con respuestas diferentes (FIG. 20B).

Las FIGS. 21A y 21B muestran gráficos que muestran fenotipos de células de composiciones que contienen células CAR+ anti-CD19 que se produjeron mediante el proceso descrito en el Ejemplo 1 (A) y el proceso alternativo descrito en el Ejemplo 2 (B). La FIG. 21A muestra un diagrama de cajas que muestra el porcentaje de células con marcador de apoptosis (Anexina V-) entre las células CD8+CAR+. La FIG. 21B muestra un gráfico que muestra los valores de composiciones celulares individuales para células CD8+CAR+ anexionnegativas dosificadas y producción de citocinas para composiciones celulares producidas por un proceso ejemplar A y un proceso ejemplar B. Los recuadros sombreados indican las distribuciones observadas.

La FIG. 22 muestra puntos de datos individuales del número/kg de células CD3+CAR+ administradas ($\times 10^6$ células/kg) a sujetos que desarrollaron neurotoxicidad de grado 0-2 o grado 3-5.

Las FIGS. 23A-C muestran gráficos de cajas que comparan composiciones de células T que contienen células que expresan un CAR anti-CD19. Las FIGS. 23A y 23B muestran gráficos de caja que comparan composiciones de células T que contienen que fueron tratadas con el mismo reactivo de diferentes lotes durante la producción. La FIG. 23A cuantifica la producción de TNF-alfa tras el estímulo con CD19 por célula. La FIG. 23B muestra la frecuencia de células CD27+/CD28+ entre las células CD8+CAR+. Se muestran los puntos de datos de las composiciones de células T asociadas a un grado de neurotoxicidad de 0-2 (cuadrado), 3 (estrella con flecha), 3 prolongado (3p; rombo), 4 (pentágono con flecha) y 5 (círculo). La FIG. 23C muestra la producción de TNF-alfa tras el estímulo con células que expresan CD19 en composiciones de células T que contienen células que expresan un CAR anti-CD19 que se generaron con el mismo medio que se almacenó en diferentes condiciones.

La FIG. 24 muestra diagramas de caja que muestran la pureza de células T de composiciones de células T enriquecidas para células CD4+ y CD8+ en diferentes etapas del proceso para generar composiciones celulares de ingeniería que contienen células T CAR que se describe en el Ejemplo 8. Se muestra la frecuencia (% del total de leucocitos) de células CD4+ y CD8+ en las composiciones.

La FIG. 25 muestra un gráfico que representa los niveles de células T CD3+ en dosis individuales en el nivel de dosis 1 (DL1) y en el nivel de dosis 2 (DL2).

La FIG. 26 muestra gráficos de caja que muestran la concentración, viabilidad y frecuencia de células T CD4+ y CD8+ caspasa-3 negativas de composiciones celulares terapéuticas que contienen células CAR-T en un volumen de formulación alto o bajo.

La FIG. 27 muestra gráficos que muestran la dosis controlada, los fenotipos de las células T y la función celular específica de la composición celular terapéutica individual que contiene células T CAR que se infundieron. Se muestran los puntos de datos de las cantidades de CD4+CAR+, CD8+CAR+, CD4+CAR+TNF- α , CD8+CAR+TNF- α , CD4+CAR+CCR7+, CD8+CAR+CCR7+ infundidas en sujetos individuales.

La FIG. 28 muestra un gráfico que muestra (i) para cada uno de una serie de sujetos individuales, puntos individuales no recuadrados que indican la medida PK máxima (número de células T CAR+/ μ L de sangre (medida PK) en el pico (en una base individual sujeto por sujeto, el punto temporal en el que se midió el número más alto de células T CAR+, entre los puntos temporales en los que se evaluó el número de células T CAR+ tras el tratamiento del sujeto con composiciones de células T anti-CD19 que expresan CAR) (con puntos que también indican el grado más alto de neurotoxicidad observado para cada sujeto: neurotoxicidad de grado 0-2 (cuadrado), grado 3 (estrella), neurotoxicidad prolongada de grado 3 (rombo), grado 4 (pentágono con flecha), o grado 5 (círculo), y (ii) niveles medios, para aquellos

de dichos pacientes que se considera que han tenido un pico temprano o tardío de células T CAR+ (indicado por líneas superior e inferior con puntos en recuadro con barras de intervalo, respectivamente) de IL-15 (picogramos/mL) en suero en varios puntos temporales indicados antes y después de la administración de dichas composiciones de células T. El óvalo indica los sujetos en los que se observó una expansión temprana y rápida de las células CAR-T, en comparación con otros sujetos.

Descripción Detallada

[0015] Las realizaciones de la invención están comprendidas en algunos de los casos que se describen a continuación. Toda referencia que se haga en el presente documento a los métodos de tratamiento se entenderá hecha a los productos utilizados en dichos métodos.

[0016] Los títulos de las secciones que se utilizan en el presente documento tienen únicamente fines organizativos y no deben interpretarse como una limitación de la materia descrita.

I. DOSIS Y DETERMINACIÓN DE DOSIS EN COMPOSICIONES TERAPÉUTICAS DE CÉLULAS T PARA REDUCIR EL RIESGO DE TOXICIDAD

[0017] En el presente documento se describen métodos, composiciones y artículos de fabricación para su uso en relación con la terapia celular, como la terapia celular T de ingeniería para el tratamiento de enfermedades y afecciones, incluidos varios tumores. Los casos aquí divulgados se refieren a composiciones de células T terapéuticas que contienen células T modificadas por ingeniería, como las modificadas para expresar proteínas recombinantes, como las que expresan receptores recombinantes diseñados para reconocer y/o unirse específicamente a moléculas asociadas con la enfermedad o afección y dar lugar a una respuesta, como una respuesta inmunitaria contra dichas moléculas al unirse a dichas moléculas. Los receptores pueden incluir receptores quiméricos, por ej., receptores antigénicos quiméricos (CAR), y otros receptores antigénicos transgénicos, incluidos los receptores transgénicos de células T (TCR).

[0018] Los casos aquí divulgados se refieren a divulgaciones en las que ciertos parámetros relacionados con la función o la actividad de la composición de células T terapéuticas, por ejemplo, la actividad dependiente del receptor específico de antígeno o recombinante, pueden predecir el riesgo de la probabilidad de desarrollar un acontecimiento adverso o toxicidad, como neurotoxicidad grave, en un sujeto administrado la composición de células T y/o pueden proporcionar información sobre la potencia de la composición de células T terapéuticas. Algunos de los casos divulgados en el presente documento también se refieren a la administración o suministro de una dosis unitaria que contiene un número de unidades, tal como un número objetivo de unidades, que es una función del número de células de un determinado fenotipo, tal como un fenotipo indicativo de células biológicamente activas o una población celular, y la función o actividad de las células presentes en la composición de células T terapéuticas, por ejemplo, actividad específica de antígeno o dependiente de receptor recombinante, incluyendo para su uso en relación con la dosificación de la composición de células T terapéuticas. En algunas divulgaciones, los métodos divulgados pueden mejorar o reducir el riesgo de toxicidad en un sujeto al que se administra una dosis de la composición de células T terapéuticas, al tiempo que se garantiza la potencia de la composición de células T. También se divulgan artículos de fabricación que contienen las células y están diseñados para su administración siguiendo dichos regímenes de dosificación.

[0019] En algunas divulgaciones, los métodos, dosis, dosis unitarias, composiciones y artículos de fabricación divulgados se basan en observaciones de que puede ser ventajoso tener en cuenta ciertos parámetros y combinaciones de los mismos al determinar la dosis apropiada de terapia celular y/o liberar composiciones celulares para terapia. En algunos métodos disponibles, las dosis se basan en el número de tipos celulares particulares, como los diseñados para mostrar una actividad particular, como los positivos para un receptor diseñado. Por ejemplo, en ciertos métodos y dosis disponibles, la dosis se basa en una relación observada o sospechada entre el número (o número por peso del paciente) de células T de ingeniería viables, o de un subconjunto de las mismas, como de células T de ingeniería citotóxicas viables (por ejemplo, CD8+). En diversos contextos, estas cifras pueden guardar relación con los resultados de eficacia y/o seguridad, como la respuesta y/o el riesgo de toxicidades como la neurotoxicidad (NTx), el edema cerebral y CRS. Se divulgan aquí divulgaciones basadas en la observación de que, no obstante, tales métricas en algunos contextos no predicen adecuadamente de manera consistente el riesgo de toxicidades, por ejemplo, de neurotoxicidad grave o edema cerebral, particularmente sin tener en cuenta otras variables. En consecuencia, los enfoques para definir la dosis y evaluar el producto para su liberación que se basan únicamente en tales métricas pueden no ser del todo satisfactorios. Por ejemplo, en algunos contextos estos enfoques pueden no definir un margen de seguridad adecuado y/o una ventana terapéutica, para una terapia celular segura y eficaz. En el presente documento se describen métodos (incluidos métodos de tratamiento, dosificación, determinación de dosis y ensayo de liberación), así como dosis y composiciones terapéuticas que abordan dichas deficiencias.

[0020] En algunas divulgaciones, se encuentra aquí que ciertos atributos específicos del producto y factores clínicos o específicos del paciente pueden impactar el riesgo, riesgo relativo o probabilidad de desarrollar una toxicidad después de la administración de una terapia celular. En algunos casos, la variabilidad en dichos atributos específicos del producto y/o del paciente puede dar lugar a variabilidad en los atributos de las dosis de composiciones celulares terapéuticas administradas a diferentes individuos dentro de un grupo de sujetos y/o a los resultados observados en dichos individuos diferentes tras dicha administración. En algunas divulgaciones, dicha variabilidad se observa a pesar de ciertas similitudes

en las dosis administradas a los distintos sujetos individuales, como cuando la dosis o composición administrada contiene células diseñadas para expresar el mismo receptor diseñado, como el receptor de antígeno quimérico, que contiene o está transcrito o transfectado con el mismo vector; en algunas divulgaciones, las distintas dosis o composiciones administradas a los distintos sujetos incluyen o contienen o consisten en el mismo número (o número por peso u otra característica de un sujeto) de células (o células de un fenotipo particular). En algunas divulgaciones, el control de la variabilidad de uno o más atributos de la composición celular puede minimizar dichos riesgos y/o minimizar dicha variabilidad en atributos de dosis o resultados. En algunas divulgaciones, la minimización o el control de la variabilidad, como el grado de varianza en (o el aumento de la consistencia en) uno o más atributos del producto o de la composición a través de sujetos a los que se administra una terapia particular, puede minimizar el impacto de la variabilidad en los atributos del resultado o de la dosis entre pacientes con variabilidad en factores específicos del paciente o factores clínicos que de otro modo impactarían en dichos atributos del resultado o de la dosis. Por ejemplo, en algunas divulgaciones, la reducción de la variabilidad en los atributos del producto o de la composición puede reducir la variabilidad o puede reducir el riesgo o la probabilidad de que un sujeto o una población de sujetos desarrolle una toxicidad relacionada con el tratamiento, como neurotoxicidad o edema cerebral, o su grado, sin reducir o reduciendo sustancialmente la probabilidad de lograr una respuesta o un resultado clínico particular. En algunos casos, reducir la variabilidad en función de factores clínicos o específicos del paciente puede minimizar el riesgo de desarrollar una toxicidad, como una neurotoxicidad o un edema cerebral, tras la administración de una terapia celular.

[0021] En algunas divulgaciones, la variabilidad entre las dosis unitarias de una composición celular puede deberse a uno o más aspectos de los procesos de fabricación empleados en la generación o fabricación de una terapia celular de ingeniería. En algunos casos, los cambios en las materias primas o en su manipulación o almacenamiento pueden afectar a las variables observadas en el presente documento para influir en el riesgo de toxicidad y/o en los resultados. En algunas divulgaciones, la variabilidad lote a lote o el almacenamiento/manipulación de materias primas y/o el uso de diferentes materias primas entre procesos llevados a cabo a través de un número de sujetos, puede impactar, por ejemplo aumentando la variabilidad de o aumentando o disminuyendo, ciertos aspectos de las composiciones celulares generadas, tales como aspectos que, si varían, pueden dar lugar a variabilidad en el riesgo de toxicidad o resultados clínicos entre sujetos administrados terapias celulares, particularmente entre tales sujetos que difieren en ciertos atributos específicos del paciente. En algunos casos, en el presente documento se divulgan enfoques que implican la evaluación, el ensayo y/o el control del impacto potencial o la variabilidad en uno o más de dichos atributos o riesgos o probabilidades del producto, como resultado de una materia prima, lote, reactivo, almacenamiento o manipulación de los mismos, o de un cambio en los mismos. En algunas divulgaciones, dichos enfoques incluyen ensayos como los realizados antes del uso de dicha materia prima, lote, almacenamiento o manipulación, en la producción de una composición celular que se administrará a un sujeto o antes de dicha administración. En algunas divulgaciones, los ensayos evalúan el impacto de la materia prima, lote, cambio o método de manipulación o almacenamiento, sobre uno o más atributos en una composición celular como los observados aquí para impactar el riesgo de toxicidad o resultado o para exacerbar el impacto de la variabilidad de paciente a paciente en tales resultados. En algunas divulgaciones, los ensayos evalúan si un grado aceptablemente bajo de varianza en, en comparación con otro material, lote, o método de almacenamiento o manipulación, o un impacto aceptablemente bajo, en tales uno o más atributos. En algunas divulgaciones, la materia prima, el lote o el método de almacenamiento o manipulación se liberan para su uso en la fabricación de la terapia celular que se administrará al paciente -o dicha terapia celular se administra al paciente- si, por ejemplo, sólo si o sólo después de que el ensayo confirme que dicha variación o impacto se encuentra dentro del intervalo o valor o límite aceptable. En algunas de tales divulgaciones, tales parámetros evaluados pueden incluir número o porcentaje de células biológicamente activas, células no apoptóticas, células sanas, células de una potencia particular (o número o porcentaje de células biológicamente activas, no apoptóticas, o sanas o potentes de un fenotipo dado) y/o una métrica indicativa de la potencia, tal como la potencia por célula, de la composición. En algunas divulgaciones, determinar que la variabilidad en uno o más de dichos atributos está por debajo de un cierto nivel con una nueva materia prima o lote o método de almacenamiento o manipulación, puede mitigar el riesgo de toxicidad o reducción de la respuesta tras la implementación de dicha nueva materia prima o lote o método de almacenamiento o manipulación. En algunas divulgaciones, entre tales métodos divulgados hay métodos que ensayan una composición antes de la liberación del producto y/o ajustan la estrategia de dosificación basándose en tales parámetros.

[0022] En algunas divulgaciones, uno o más riesgos o resultados, como el riesgo de toxicidad o la dosis adecuada, pueden depender o variar con una o más variables específicas del tratamiento o del paciente. Por ejemplo, entre los atributos clínicos y del paciente ejemplares que pueden correlacionarse en algunas divulgaciones con el riesgo de ciertas toxicidades, incluida la neurotoxicidad o el edema cerebral o su grado, se incluyen la salud o la edad del paciente (por ejemplo, si el paciente tenía más o menos de 30 años de edad), el historial de tratamiento previo, incluido el número de tratamientos previos y/o si un paciente ha recibido una quimioterapia linfodepletora y/o de retención antes del tratamiento, como una que incluya fludarabina. En particular, entre dichos atributos clínicos o del paciente que pueden aumentar el riesgo, el riesgo relativo y/o la probabilidad de desarrollar una toxicidad tras la administración de una dosis de células de una terapia celular (por ejemplo, terapia celular CAR-T), se incluyen, por ejemplo, menos terapias previas, como dos o menos terapias previas, edad joven, por ejemplo, menos de 30 años, proporción de células T CD4+ a CD8+ en una muestra de aféresis de un paciente o número de células administradas a un sujeto debido a una dosificación basada en el peso de las células, por ejemplo, menos de 30 años de edad, proporción de células T CD4Por ejemplo, menos de 30 años de edad, la proporción de células T CD4+ a CD8+ en una muestra de aféresis de un paciente o el número de células administradas a un sujeto debido a la dosificación de células en función del peso, por ejemplo, más células administradas a sujetos con un peso mayor. Dichos atributos pueden afectar a los atributos resultantes de una composición celular

generada a partir del sujeto y/o a los factores del paciente en el momento de la infusión que pueden contribuir al riesgo de desarrollar toxicidad tras la administración de una terapia celular (por ejemplo, células T CAR). Se divulgan enfoques que disminuyen la variabilidad en los resultados y/o el riesgo de toxicidades entre pacientes con variabilidad en uno o más de dichos atributos específicos del paciente o del tratamiento. También se divulgan enfoques que tienen en cuenta dichos atributos específicos del paciente o del tratamiento al determinar o formular o administrar una dosis de la terapia celular a un paciente o pacientes.

[0023] En algunas divulgaciones, los enfoques divulgados tales como métodos de administración y dosis incluyen (o incluyen la administración de) menos células o menos células biológicamente activas o potentes (o células diseñadas) en una dosis administrada a un sujeto que es más saludable, es más joven, por ejemplo, menor de 30 años de edad, ha tenido menos terapias previas, por ejemplo, dos o menos terapias previas, o ha tenido un cierto tratamiento previo tal como una terapia o quimioterapia linfodepletor, tal como una que incluya fludarabina, y/o trasplante. En otras divulgaciones, los atributos del proceso o enfoque de dosificación tienen en cuenta la variabilidad en dichos factores específicos del paciente, por ejemplo, de tal manera que dichos factores específicos del paciente no dan lugar o no dan lugar a una variabilidad sustancial en la toxicidad u otro riesgo. En algunas divulgaciones, los métodos divulgados implementan dosificación plana, por ejemplo, número total de células CAR+, número total de células T CAR+CD8+ y/o células T CAR+/CD4+, como para administrar una dosis precisa o fija de dicho(s) tipo(s) celular(es) a cada uno de un grupo de sujetos tratados, incluidos sujetos de peso variable. En algunas divulgaciones, las variables específicas del paciente son relevantes para la dosificación si la terapia es autóloga, de tal manera que las propiedades de las células del paciente serán relevantes para la salud o función o aptitud de las células en la composición.

[0024] En algunas divulgaciones, ciertos factores clínicos o del paciente pueden amplificar la expansión de las células administradas de una terapia celular dentro de un sujeto al que se administra la terapia, lo que, en algunos casos, puede tener un impacto, como un aumento, o estar asociado con un aumento del riesgo, riesgo relativo o probabilidad de desarrollar una toxicidad, por ejemplo neurotoxicidad, tras la administración de una terapia celular. En algunas divulgaciones, los factores clínicos o del paciente que se asocian con el riesgo de desarrollar una toxicidad, como neurotoxicidad o edema cerebral, incluyen el tipo de enfermedad (p. ej. ALL); la carga de la enfermedad (p. ej. p. ej., determinada por una medida volumétrica o la presencia de un marcador inflamatorio); si el sujeto ha recibido una quimioterapia puente previa o una terapia de linfodepleción, como la que incluye fludarabina (Flu) o ciclofosfamida y fludarabina (CY/Flu); el pico de expansión temprana de células T recombinantes receptoras (p. ej., CAR).p. ej. CAR)-T en la sangre, por ejemplo en los 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días siguientes al inicio de la administración de la terapia celular; y/o la presencia de niveles máximos de IL-15, por ejemplo superiores o iguales a 30 pg/mL, en la sangre o el suero, por ejemplo en los 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días siguientes al inicio de la administración de la terapia celular. En algunas divulgaciones, los enfoques divulgados, como los procesos divulgados y/o las estrategias de dosificación, como los enfoques para controlar la dosis y/o la variabilidad, pueden minimizar o reducir dichos riesgos y/o minimizar el impacto de los factores clínicos o del paciente en dichos riesgos o resultados. Entre estos enfoques se encuentran aquellos en los que dichos factores se tienen en cuenta a la hora de ajustar o determinar la dosis a dichos sujetos y aquellos en los que se utilizan atributos del proceso o de la dosificación que minimizan el impacto de dichos factores sobre el riesgo de toxicidad o el resultado.

[0025] En algunas divulgaciones, las composiciones, dosis y métodos divulgados son ventajosos porque limitan la variabilidad, en la dosis de células administradas a sujetos individuales, en factores observados que se correlacionan con eventos adversos tales como toxicidades tales como neurotoxicidades, incluyendo formas severas de neurotoxicidad y/o edema cerebral. Dicha variabilidad se limita o reduce en algunas divulgaciones mediante un enfoque de determinación de la dosis que tiene en cuenta o corrige dicha variabilidad, por ejemplo, la dosificación basada en el número de células o el fenotipo de las células que presentan una propiedad que se sabe que se correlaciona con un acontecimiento adverso. En algunas divulgaciones, la variabilidad se limita mediante el uso de un ensayo de liberación que tiene en cuenta dicha variabilidad. En algunas divulgaciones, además del número de células T modificadas, la dosis y/o la liberación del producto se basan además en una o más de una combinación de métricas importantes. Tales métricas en algunas divulgaciones incluyen parámetros indicativos del grado en que las células viables son biológicamente activas o sanas (por ejemplo, no programadas para la muerte), que en algunas divulgaciones se determina basándose en la ausencia de marcador apoptótico detectable, y/o basándose en niveles relativamente bajos de producción intracelular de ciertos factores, en comparación con las células moribundas o apoptóticas. En algunas divulgaciones, la métrica incluye la frecuencia de células CD8+ manipuladas, en lugar de considerar únicamente el número de células T manipuladas en su conjunto y/o la proporción de células CD4:CD8 entre las células manipuladas. En algunas divulgaciones, las métricas incluyen parámetros indicativos del grado de actividad antígeno-específica o célula-específica presente en la composición, tales como medidas del grado en que las células en la composición son capaces de ejercer ciertas actividades o funciones, tales como la secreción de ciertos factores (tales como citoquinas proinflamatorias) en respuesta a la estimulación antígeno-específica o célula-específica.

[0026] En algunas divulgaciones, la dosis se basa en el número de células T de ingeniería biológicamente activas; en algunas divulgaciones, biológicamente activas se refiere a una propiedad de las células no programadas para sufrir muerte celular, por ejemplo, una propiedad de células no apoptóticas o células que no muestran indicaciones de entrada en una vía apoptótica. En algunas divulgaciones, la dosis se basa en el número de células T CD8+ biológicamente activas obtenidas por ingeniería, y/o, cuando la dosis se basa en el número total de células T biológicamente activas obtenidas por ingeniería, también se especifica un límite superior o número umbral de células T CD8+ biológicamente activas obtenidas por ingeniería.

- [0027]** En algunas divulgaciones, asegurar que una dosis unitaria abarque un número relativamente consistente de células de ingeniería biológicamente activas se logra en parte por un proceso de producción celular que exhibe una varianza en dicha población biológicamente activa que es baja o por debajo de una varianza aceptable o umbral, entre composiciones producidas por el proceso, incluyendo aquellas derivadas de muestras de un número de sujetos diferentes, tales como aquellas que tienen diferentes características, tales como sujetos de diferentes edades, números y/o tipos de terapias previas, e indicación y subtipo o gravedad o grado de la misma. En algunas divulgaciones, dichos procesos generan una frecuencia de dicha población biológicamente activa que varía en no más del 20% o no más del 10% o no más del 5% de una media de dicha frecuencia en una pluralidad de composiciones de células T producidas por el proceso y/o varía de dicha media en no más de una desviación estándar o varía en no más del 20%, o no más del 10%, o no más del 5% entre una pluralidad de composiciones de células T producidas por el proceso entre dichas diversas muestras y pacientes. En algunas de estas divulgaciones, la dosis se basa en el número (o número por peso o altura o volumen sanguíneo del paciente) de células T modificadas por ingeniería o células T CD8+ modificadas por ingeniería, teniendo en cuenta la frecuencia esperada de células biológicamente activas o no apoptóticas entre dichas células, y/o la varianza en dicha frecuencia a través de composiciones celulares modificadas por ingeniería a partir de una población representativa de sujetos. En algunas divulgaciones, el número de la población de células en la dosis se selecciona para proporcionar un margen de seguridad adecuado, por ejemplo, para estar por debajo de un valor umbral, teniendo en cuenta dicha varianza y frecuencia.
- [0028]** En algunas divulgaciones, la liberación de dosis y/o producto se basa además en una métrica indicativa de potencia, por ejemplo, una medida particular de actividad específica de antígeno o célula que proporciona información con respecto al riesgo de un evento adverso o toxicidad. En algunas divulgaciones, dicha métrica es o incluye un parámetro observado o descrito en el presente documento que se correlaciona con el riesgo de un acontecimiento adverso tal como neurotoxicidad o edema cerebral graves o de un grado particular (por ejemplo, grado 3, grado 3 prolongado, grado 4 y/o grado 5). En algunas divulgaciones, el parámetro es indicativo de la liberación específica de células o antígenos de ingeniería de una citoquina inflamatoria, y/o de una o una combinación de TNF α , IFN γ , IL-2 e IL-10.
- [0029]** En algunas divulgaciones, el enfoque tiene en cuenta además la variabilidad (por ejemplo, entre células obtenidas por ingeniería a partir de diferentes sujetos y/o el uso de diferentes materias primas tales como reactivos de activación en el proceso). Por ejemplo, en algunas divulgaciones, el parámetro indicativo de la actividad o potencia específica de la célula se normaliza frente a una medida similar, que puede variar entre dichos sujetos o procesos, pero no predice el resultado adverso. Por ejemplo, el parámetro indicativo de la actividad específica de la célula (p. ej., medida de la secreción específica de antígeno de una citocina proinflamatoria) puede en algunas divulgaciones normalizarse frente a o en relación con otro parámetro, como la liberación específica de antígeno o célula de un factor que no se correlaciona con o predice el resultado no deseado, como neurotoxicidad grave o de grado (p. ej., grado 3, grado 3 prolongado, grado 4 y/o grado 5) o edema cerebral. Por ejemplo, se observa que en algunas revelaciones, la secreción de citocinas como IL-5, IL-13, GM-CSF e IL-6 no se correlaciona con el resultado no deseado ni lo predice. En respuesta al antígeno específico de la célula, si bien puede variar entre células obtenidas por ingeniería a partir de diferentes sujetos (por ejemplo, variabilidad de paciente a paciente), la variabilidad en este parámetro generalmente no se correlaciona con o predice el riesgo del resultado no deseado, como neurotoxicidad grave o de grado (por ejemplo, grado 3, grado 3 prolongado, grado 4 y/o grado 5) o edema cerebral. En algunas divulgaciones, la secreción de una o más de dichas citocinas puede servir como factor de control, como una media aritmética o media geométrica de una medida de dos o más IL-5, IL-13, GM-CSF e IL-6.
- [0030]** En algunas divulgaciones, los métodos actualmente disponibles no son satisfactorios para caracterizar tanto la seguridad como la eficacia de una composición de células T terapéuticas. Por ejemplo, en algunos casos los métodos actuales utilizan un parámetro de liberación de umbral inferior (por ejemplo, medir la liberación de interferongamma de una composición terapéutica de células T), que no incluye un límite superior de seguridad. En algunos casos, una composición de células T terapéuticas no se liberará para su uso posterior como terapia a menos que se cumpla el umbral inferior; por ejemplo, si la composición de células T terapéuticas no libera por encima de una cantidad umbral de citocina en un ensayo definido, la composición no se liberará para su infusión en un paciente. En algunas divulgaciones, dichos parámetros pueden incluir la liberación de citocinas, la liberación de gránulos citotóxicos y la determinación del estado de activación de las células T (por ejemplo, un determinado porcentaje de células que expresan uno o más marcadores de activación). En algunas divulgaciones, los parámetros utilizados actualmente incluyen límites inferiores de porcentajes de células CAR+ y/o células que presentan un fenotipo específico. En algunos métodos, es posible que, aunque la eficacia pueda controlarse garantizando que una composición de células T terapéuticas tenga una actividad mínima (es decir, libere una cantidad mínima de citocina y/o funcione a un nivel determinado en un ensayo de citotoxicidad) o un fenotipo, no se determine si la composición es segura de administrar o no utilizando un límite superior de parámetros similares.
- [0031]** Los casos aquí divulgados se basan en hallazgos de que ciertos fenotipos y/o parámetros asociados con la función o actividad de una composición terapéutica de células T se asocian con un riesgo de desarrollar una toxicidad, por ejemplo, neurotoxicidad grave, en un sujeto al que se le administra la composición de células T. En algunas divulgaciones, se encuentra que la aptitud de las células que se administran es una característica que se correlaciona con un riesgo de toxicidad. En algunas divulgaciones, el número o la dosis de células administradas a un sujeto que tienen un fenotipo que indica actividad biológica, como células que no tienen un fenotipo apoptótico y/o que tienen un fenotipo que no muestra un parámetro indicativo de apoptosis (por ejemplo, un parámetro indicativo de apoptosis temprana o tardía, como la

detectada por Anexina V) y/o que producen ciertas citocinas (por ejemplo, citocinas proinflamatorias), puede correlacionarse con un riesgo de toxicidad. En algunas divulgaciones, los sujetos que reciben un mayor número total de células, como las basadas en el total de células CD3+CAR+ o células CD8+CAR+ o un subconjunto de las mismas, pueden tener un mayor riesgo de desarrollar una toxicidad grave que un sujeto que recibe un menor número total de dichas células. En algunos casos, ciertos regímenes de dosificación que no tienen en cuenta el número total de células con dichas características y/o en los que existe un alto grado de variabilidad en el fenotipo o función de las células administradas entre un grupo de sujetos tratados pueden, en ciertas divulgaciones, dar lugar a un riesgo global de desarrollo de toxicidad en los sujetos tratados.

[0032] En algunas divulgaciones, se encuentra que una dosis total más baja de células administradas que exhiben tal fenotipo puede ser deseable, por ejemplo, para mejorar o minimizar el riesgo de toxicidad. Sin embargo, aunque estas características de las células pueden influir en el riesgo de toxicidad en un sujeto al que se administran las células, la administración de un número demasiado bajo de estas células puede reducir la eficacia de la composición terapéutica. Para tener en cuenta la eficacia, es habitual entre los métodos de dosificación establecer un límite inferior de potencia de una composición celular, como el basado en la actividad citolítica, la producción de una citocina u otro factor asociado con una composición terapéutica de células T, por ejemplo para garantizar que se administran suficientes células a un sujeto para lograr un efecto. Sin embargo, los estudios descritos en el presente documento demuestran que los métodos de dosificación que administran una dosis de células, incluida una dosis fija de células, en la que sólo se ha alcanzado un nivel inferior de potencia o función pueden estar poniendo a un sujeto en riesgo de toxicidad si dichas células presentan un alto nivel de actividad o función específica de antígeno.

[0033] Basándose en los hallazgos del presente documento, se divulgan métodos, composiciones y artículos de fabricación en los que una dosis unitaria de células se basa en dos funciones, (A) el número de células de un determinado fenotipo, como un fenotipo indicativo de actividad biológica y (B) el valor de un parámetro que indica o se correlaciona con la actividad dependiente del receptor recombinante y/o la actividad específica del antígeno en la composición. Las variables ejemplares que se consideran en el presente documento un indicador de A o B se describen en otras partes del presente documento, incluso en los Ejemplos. En algunas divulgaciones, la función B, tal como la producción o acumulación de citocinas específicas de antígeno, por ejemplo, citocinas proinflamatorias, es una función que a menudo puede diferir y/o puede ser variable entre composiciones de células T generadas a partir de células derivadas de sujetos, incluyendo factores de riesgo específicos del paciente, por ejemplo, debido a la enfermedad o afección particular del sujeto, la edad del sujeto, el peso del sujeto, tratamientos previos, y otros factores que pueden alterar o impactar uno o más atributos funcionales de las células T.

[0034] En algunas divulgaciones, se encuentra que B es un indicador de seguridad de una composición terapéutica de células T. En algunos casos, si B es demasiado alta, debe administrarse una dosis menor de células para reducir o minimizar el riesgo de toxicidad, como la neurotoxicidad grave. En algunos casos, si B está por debajo de un nivel umbral o límite, puede haber una mayor ventana en la dosis que se puede administrar, de tal manera que una dosis objetivo de células se puede administrar a un sujeto sin un riesgo conocido de desarrollar una toxicidad o evento adverso, como una toxicidad grave. En algunas divulgaciones, controlar o ajustar el número de células totales o células totales de un fenotipo particular (por ejemplo, CD3+CAR+ o CD8+CAR+ o Anexina V-CD8+CAR+) en una composición de células T terapéuticas que se administra puede estandarizar o regular las unidades totales de actividad de las composiciones de células T administradas entre los sujetos tratados, dando cuenta así de las diferencias funcionales o de actividad de B entre las células T a través de la composición de células T derivadas de un grupo de sujetos que de otro modo podrían haber conducido a un riesgo de desarrollar una toxicidad, por ejemplo, toxicidad grave, en algunos sujetos.

[0035] En algunas divulgaciones, B, que es un valor de un parámetro de un receptor recombinante dependiente (p. ej., dependiente de CAR), como la actividad específica de antígeno, puede proporcionar un control de potencia para una composición de células T. En algunas divulgaciones, un ensayo de potencia basado en la función de las células T de B puede ofrecer ventajas sobre los métodos existentes. En primer lugar, en algunas divulgaciones, los ensayos de potencia existentes para composiciones celulares se basan en características que se correlacionan con la eficacia de las células, por ejemplo, la actividad citolítica y/o la producción de IFN-gamma, en contraposición a la seguridad. Además, estos ensayos de potencia suelen tener sólo un límite inferior o un nivel de potencia dentro del ensayo.

[0036] Basándose en los hallazgos aquí expuestos, entre los casos aquí divulgados se encuentran los ensayos de potencia, como aquellos en los que existe un límite de especificación inferior (LSL) y/o un límite de especificación superior (USL). En algunas divulgaciones, el USL se basa en un parámetro B. En algunas divulgaciones, el USL proporciona una comprobación de seguridad de la composición de células T, por ejemplo en relación con un ensayo de liberación antes de administrar la composición a un sujeto. Como se ha indicado anteriormente, diversos criterios clínicos y otras características específicas de los pacientes pueden influir en el grado o alcance de la función de las células manipuladas. Asimismo, en algunos casos, el proceso global, incluidos los reactivos, utilizado en relación con la fabricación o ingeniería de una composición celular y/o en la congelación de células producidas por un proceso celular también puede conducir a la variabilidad de B entre una pluralidad de composiciones de células T producidas utilizando el mismo proceso. En algunos casos, se ha observado que la congelación de células por debajo de una densidad inferior a 15×10^6 células/mL puede dar lugar a un aumento de la variabilidad y/o a una reducción de la potencia de una composición de células T. En algunas divulgaciones, los métodos divulgados son particularmente ventajosos para evaluar composiciones celulares en las que la variabilidad de células que tienen un cierto fenotipo, tal como un fenotipo A descrito a continuación, incluyendo

un fenotipo indicativo de actividad biológica, por ejemplo Anexina V-CD8+CAR+, varía o es probable que varíe en más de un 20%, más de un 30%, más de un 40%, más de un 50% o más entre una pluralidad de composiciones de células T producidas por el proceso o a partir de una media de la frecuencia del fenotipo en una pluralidad de composiciones de células T producidas por el proceso y/o varía o es probable que varíe a partir de dicha media en no más de una desviación estándar.

[0037] En algunas divulgaciones de los métodos y dosis divulgados, las células se producen mediante un proceso diseñado para minimizar la variabilidad en factores como los observados aquí para correlacionar (solos o en combinación) con el riesgo de neurotoxicidad. En algunas divulgaciones de tales divulgaciones, la dosificación puede basarse en un número total o relativo de células de ingeniería o células T de ingeniería o población de células T, sin aumentar el riesgo de toxicidad que puede estar presente cuando las células se producen utilizando un proceso en el que tales parámetros son más variables. En algunas divulgaciones, tales procesos incluyen el uso de vectores lentivirales, proporciones definidas de subconjuntos de células T tales como células CD4 y/o CD8. En algunas divulgaciones, incluyen la ingeniería de células que incluyen un CAR con un dominio costimulador derivado de 41BB en oposición a un dominio CD28. En algunas divulgaciones, el proceso incluye proporciones controladas de subconjuntos de células T, citocinas y reactivos para permitir el control del fenotipo, la función y el estado metabólico y/o densidad celular total controlada y relativamente más alta durante la criopreservación (como entre 10 y entre 60 o entre 15 y 60 millones de células por mL, cada una inclusive), el almacenamiento y/o la descongelación de la muestra antes de la administración. En algunas divulgaciones se utiliza un proceso en el que las propiedades metabólicas y funcionales de las células T se controlan más fácilmente. En algunas divulgaciones, tales procesos se utilizan para proporcionar dosis consistentes de células biológicamente activas, incluso en el contexto de variables específicas del paciente que pueden afectar a la salud celular.

[0038] Entre las divulgaciones se encuentran aquellas en las que los procesos producen mayores frecuencias de células biológicamente activas o sanas entre las células CD8+CAR+, medidas por la negatividad de varios marcadores apoptóticos entre las muestras generadas utilizando el proceso. En algunas divulgaciones, existe un menor grado de varianza en este parámetro entre las muestras producidas por el proceso a partir de diferentes sujetos. Como se ha observado aquí, el número de tales células puede correlacionarse con neurotoxicidad de grado 5 y edema cerebral, mientras que las células CD3+CAR+ viables (sin tener en cuenta el estado apoptótico frente a las células biológicamente activas) pueden no siempre predecir la toxicidad o definir claramente un límite de seguridad con respecto a este riesgo.

[0039] En algunas divulgaciones, el uso de un proceso con variabilidad reducida en la frecuencia de tales células biológicamente activas entre las células de ingeniería, reduce el riesgo de que ciertos pacientes, como aquellos que tienen ciertos factores de riesgo específicos del paciente como se describe (por ejemplo, aquellos que tienen células menos propensas a la apoptosis o que son más saludables) reciban inadvertidamente una dosis más alta que la prevista de células biológicamente activas, cuando se dosifica en base a los números de células T de ingeniería como un todo. Se ha observado que los procesos con un mayor grado de control sobre el fenotipo y la función reducen aún más el grado de variabilidad en la capacidad de las células producidas por el proceso para fabricar citocinas inflamatorias de forma antígeno-específica. Los resultados aquí expuestos son coherentes con la interpretación de que, especialmente cuando se combina con un número de células de ingeniería biológicamente activas, puede utilizarse una estrategia de dosificación que tenga en cuenta dichos parámetros de actividad específicos de la célula (por ejemplo, de forma que un intervalo objetivo específico de dicha actividad -o no más de un umbral- esté representado en una dosis dada), para proporcionar una dosis capaz de lograr un resultado clínico o terapéutico deseado, al tiempo que se mantiene dentro de un margen de seguridad o se reduce el riesgo de toxicidad no deseada, por ejemplo, neurotoxicidad.

[0040] En algunas divulgaciones, el uso de un proceso que produce frecuencias consistentemente más altas de células de ingeniería biológicamente activas, permite el uso de dosis celulares que son mucho más bajas (desde la perspectiva de números de células de ingeniería, por ejemplo, CAR+), en comparación con otras estrategias de dosificación, en las cuales una frecuencia más alta de células de ingeniería son positivas para marcadores apoptóticos o de otra manera son menos saludables. Por ejemplo, basándose en las observaciones del presente documento, y teniendo en cuenta la observación de que las estrategias de dosificación disponibles generalmente no han tenido en cuenta la frecuencia de células apoptóticas, en algunas divulgaciones, los números de células T modificadas (por ejemplo, CAR+) (por ejemplo, células CD8+ y/o CD4+ modificadas), son tan bajos como 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40 o 50 millones de células.

[0041] Los métodos divulgados proporcionan un ensayo de liberación que puede monitorizar o evaluar composiciones celulares para determinar, si la composición se administra a un sujeto, si es probable que se correlacione con un riesgo de desarrollar una toxicidad, como neurotoxicidad grave. En algunas divulgaciones, se recomienda no administrar una composición de células T a un sujeto y/o se altera o ajusta la dosis unitaria que debe administrarse a un sujeto si B está por encima del USL. Si B está por debajo del LSU, puede liberarse un producto para su tratamiento. En algunas divulgaciones, evaluar si B está por encima de un LSL y/o por debajo de un USL también puede proporcionar información sobre si un sujeto al que se le ha administrado previamente una composición de células T está en riesgo de desarrollar una toxicidad, como una toxicidad grave. En algunas divulgaciones, la evaluación de una muestra de una composición de células T administrada a un sujeto se lleva a cabo post facto para B. En algunas divulgaciones, se determina que un sujeto al que se administra una composición de células T está en riesgo de desarrollar una toxicidad, como neurotoxicidad grave, si B está en o por encima del USL. En tales divulgaciones, un sujeto al que se le administra la composición se monitoriza y/o se trata con un agente para mejorar o reducir la probabilidad de un resultado de toxicidad, como neurotoxicidad o

síndrome de liberación de citoquinas, tras la administración de la composición celular y opcionalmente antes del desarrollo de un signo o síntoma del resultado de toxicidad.

[0042] En algunas divulgaciones, los casos aquí divulgados se basan en observaciones de que la eficacia de la terapia celular adoptiva puede estar limitada por el desarrollo de toxicidad en el sujeto al que se administran dichas células, toxicidad que en algunos casos puede ser grave. Por ejemplo, en algunos casos, la administración de una dosis de células que expresan un receptor recombinante, por ejemplo un CAR, puede provocar toxicidad o riesgo de toxicidad, como CRS o neurotoxicidad. En algunos casos, aunque una dosis más alta de dichas células puede aumentar la eficacia del tratamiento, por ejemplo, al aumentar la exposición a las células, como al promover la expansión y/o la persistencia, también pueden dar lugar a un riesgo aún mayor de desarrollar una toxicidad o una toxicidad más grave. Además, en algunos casos, los sujetos con una mayor carga de enfermedad también pueden tener un mayor riesgo de desarrollar una toxicidad o una toxicidad más grave.

[0043] Ciertos métodos disponibles para tratar o mejorar la toxicidad pueden no ser siempre totalmente satisfactorios. Muchos de estos enfoques se centran, por ejemplo, en combatir los efectos secundarios de la toxicidad, como el bloqueo de citocinas, y/o en administrar agentes como dosis elevadas de esteroides, que también pueden eliminar o alterar la función de las células administradas. Además, estos enfoques a menudo implican la administración de dichas intervenciones sólo tras la detección de signos o síntomas físicos de toxicidad, que en general implican signos o síntomas de toxicidad moderada o grave (por ejemplo, CRS moderado o grave). Muchos de estos otros enfoques tampoco evitan otras formas de toxicidad, como la neurotoxicidad, que puede asociarse a la terapia celular adoptiva. En algunos casos, esto ocurre en un momento en el que dichos síntomas son graves y que, por lo tanto, pueden requerir tratamientos aún más duros o extremos (por ejemplo, dosis más altas o una mayor frecuencia de administración) para mejorar o tratar la toxicidad.

[0044] El uso de ciertos enfoques alternativos no proporciona soluciones satisfactorias a estas cuestiones. En algunos casos, estos agentes y terapias (por ejemplo, los esteroides) están asociados a efectos secundarios tóxicos. Dichos efectos secundarios pueden ser aún mayores en la dosis o frecuencia más alta en la que es necesario administrar o tratar con el agente o terapia para tratar o mejorar la gravedad de la toxicidad que puede resultar de la terapia celular. Además, en algunos casos, se cree que un agente o terapia para tratar una toxicidad puede limitar la eficacia de la terapia celular, como la eficacia del receptor quimérico (por ejemplo, CAR) expresado en células proporcionadas como parte de la terapia celular (Sentman (2013) Immunotherapy, 5:10).

[0045] Los casos aquí divulgados ofrecen ventajas a la hora de tratar o abordar el riesgo de toxicidad, como la neurotoxicidad grave, en sujetos a los que se administra una composición terapéutica de células T. En algunas divulgaciones, la probabilidad de que un sujeto desarrolle una toxicidad, como una neurotoxicidad grave, se reduce o previene mediante los casos aquí divulgados en los que las características de seguridad de la composición se evalúan y/o ajustan mediante la dosificación del sujeto. En algunas divulgaciones, la probabilidad de que un sujeto desarrolle una toxicidad, como una toxicidad grave, se reduce o previene mediante el control o la evaluación de la seguridad de una composición de células T terapéuticas antes de su liberación para la administración a un sujeto y/o mediante la administración de una dosis unitaria de células que no contenga más de una dosis objetivo de células o en o no más de un número objetivo de unidades de referencia (RU) de células.

[0046] En algunas divulgaciones, los casos aquí divulgados están diseñados para o incluyen características que resultan en un menor grado de o un menor grado de riesgo de toxicidad, un resultado o síntoma tóxico, perfil, factor o propiedad que promueva la toxicidad, tal como un síntoma o resultado asociado con o indicativo de síndrome de liberación de citoquinas (CRS) o neurotoxicidad, por ejemplo, en comparación con otros métodos en los que la composición de células T terapéuticas no se ha evaluado en un ensayo para el control de la seguridad y/o en los que la composición de células T terapéuticas no se ha administrado a un sujeto de acuerdo con la fórmula de dosificación divulgada teniendo en cuenta A y B y/o la dosificación a un número objetivo de RU, tal como menos de un número umbral de RU, o la dosificación a un número objetivo de células o un número de células dentro de un intervalo objetivo dado, de la composición de células T terapéuticas.

Toxicidad y resultado tóxico

[0047] En algunas divulgaciones, el resultado tóxico de una terapia, tal como una terapia celular, es o está asociado con o indicativo de síndrome de liberación de citoquinas (CRS) o CRS grave (sCRS). El CRS, por ejemplo, el sCRS, puede producirse en algunos casos tras la terapia de células T adoptivas y la administración a sujetos de otros productos biológicos. Véase Davila et al.; Brentjens et al., Sci. Transl. Med. 5, 177ra38 (2013); Grupp et al., N. Engl. J. Med. 368, 1509-1518 (2013); y Kochenderfer et al., Blood 119, 2709-2720 (2012); Xu et al., Cancer Letters 343 (2014) 172-78.

[0048] Típicamente, el CRS es causado por una respuesta inmune sistémica exagerada mediada, por ejemplo, por células T, células B, células NK, monocitos y/o macrófagos. Estas células pueden liberar una gran cantidad de mediadores inflamatorios, como citocinas y quimiocinas. Las citocinas pueden desencadenar una respuesta inflamatoria aguda y/o inducir daños en los órganos endoteliales, que pueden dar lugar a fugas microvasculares, insuficiencia cardíaca o muerte. El CRS grave y potencialmente mortal puede provocar infiltración pulmonar y lesión pulmonar, insuficiencia renal o coagulación intravascular diseminada. Otras toxicidades graves y potencialmente mortales pueden incluir toxicidad

cardiaca, dificultad respiratoria, toxicidad neurológica y/o insuficiencia hepática.

[0049] Los resultados, signos y síntomas del CRS son conocidos e incluyen los aquí descritos. En algunas divulgaciones, cuando un régimen de dosificación o administración particular afecta o no afecta a un resultado, signo o síntoma determinado asociado al CRS, pueden especificarse resultados, signos y síntomas particulares y/o cantidades o grados de los mismos.

[0050] En el contexto de la administración de células que expresan CAR, CRS, como el CRS grave, suele producirse entre 6 y 20 días después de la infusión de células que expresan un CAR. Véase Xu et al., Cancer Letters 343 (2014) 172-78. En algunos casos, el CRS se produce menos de 6 días o más de 20 días después de la infusión de células T CAR. La incidencia y el momento del CRS pueden estar relacionados con los niveles basales de citocinas o la carga tumoral en el momento de la infusión. Comúnmente, el CRS implica niveles séricos elevados de interferón (IFN)- γ , factor de necrosis tumoral (TNF)- α , y/o interleucina (IL)-2. Otras citocinas que pueden inducirse rápidamente en el CRS son la IL-1 β , la IL-6, la IL-8 y la IL-10.

[0051] Se han desarrollado criterios de CRS que parecen correlacionarse con la aparición de CRS para predecir qué pacientes tienen más probabilidades de correr el riesgo de desarrollar CRS (véase Davilla et al. Medicina traslacional científica. 2014;6(224):224ra25). Los factores incluyen fiebres, hipoxia, hipotensión, cambios neurológicos, niveles séricos elevados de citocinas inflamatorias, como un conjunto de siete citocinas (IFN γ , IL-5, IL-6, IL-10, Flt-3L, fractalkina y GM-CSF) cuya elevación inducida por el tratamiento puede correlacionarse bien tanto con la carga tumoral previa al tratamiento como con los síntomas del sCRS. Se conocen otras directrices sobre el diagnóstico y el tratamiento del CRS (véase, por ejemplo, Lee et al, Blood. 2014; 124(2): 188-95). En algunas divulgaciones, los criterios que reflejan el grado CRS son los que se detallan en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1: Criterios de Clasificación Ejemplares para CRS	
Grado	Descripción de los Síntomas
1 Leve	No mortal, requieren solo tratamiento sintomático tal como antipiréticos y antieméticos (por ejemplo, fiebre, náuseas, fatiga, dolor de cabeza, mialgias, malestar)
2 Moderado	Requieren y responden a intervención moderada: • Requerimiento de oxígeno $<40\%$, o • Hipotensión sensible a fluidos o dosis baja de un vasopresor, o • Toxicidad orgánica grado 2 CTCAE v4.0)
3 Grave	Requieren y responden a intervención agresiva: • Requerimiento de oxígeno $\geq 40\%$, o • Hipotensión que requiere dosis alta de un vasopresor (por ejemplo, norepinefrina ≥ 20 $\mu\text{g/kg/min}$, dopamina ≥ 10 $\mu\text{g/kg/min}$, fenilefrina ≥ 200 $\mu\text{g/kg/min}$, o epinefrina ≥ 10 $\mu\text{g/kg/min}$, o • Hipotensión que requiere múltiples vasopresores (por ejemplo, vasopresina + uno de los agentes anteriores, o una combinación de vasopresores equivalente a ≥ 20 $\mu\text{g/kg/min}$ de norepinefrina), o • Toxicidad orgánica grado 3 o transaminitis grado 4 (por CTCAE v4.0)
4 Mortal	Mortal: • Requerimiento para ventilación asistida, o • Toxicidad orgánica grado 4 (excluyendo transaminitis)
5 Fatal	Muerte

[0052] En algunas divulgaciones, se considera que un sujeto desarrolla "CRS grave" ("sCRS") en respuesta a o secundario a la administración de una terapia celular o dosis de células de la misma, si, tras la administración, el sujeto muestra: (1) fiebre de al menos 38 grados centígrados durante al menos tres días; (2) elevación de citoquinas que incluya (a) un cambio máximo del pliegue de al menos 75 para al menos dos de las siguientes siete citoquinas en comparación con el nivel inmediatamente posterior a la administración: interferón gamma (IFN γ), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, fracktalquina e IL-5 y/o (b) un cambio máximo del pliegue de al menos 250 para al menos una del siguiente grupo de siete citoquinas en comparación con el nivel inmediatamente posterior a la administración: interferón gamma (IFN γ), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, fracktalquina e IL-5; y (c) al menos un signo clínico de toxicidad como hipotensión (que requiera al menos un presor vasoactivo intravenoso) o hipoxia ($PO_2 < 90\%$) o uno o más trastorno(s) neurológico(s) (incluidos cambios en el estado mental, obnubilación y/o convulsiones). En algunas divulgaciones, el CRS grave incluye el CRS con un grado de 3 o superior, tal como se establece en la Tabla 1.

[0053] En algunas divulgaciones, los resultados asociados con CRS grave o CRS de grado 3 o mayor, tal como grado 4 o mayor, tal como se establece en la Tabla 1. En algunas divulgaciones, estos incluyen uno o más de los siguientes: fiebre persistente, por ejemplo, fiebre de una temperatura especificada, por ejemplo, mayor que en o aproximadamente 38 grados Celsius, durante dos o más, por ejemplo, tres o más, por ejemplo, cuatro o más días o durante al menos tres días consecutivos; fiebre superior a 38 grados centígrados o aproximadamente; elevación de citoquinas, como un cambio máximo de pliegues, por ejemplo, de al menos 75 o aproximadamente 75, en comparación con los niveles previos al tratamiento de al menos dos citoquinas (por ejemplo, al menos dos del grupo que consiste en interferón gamma (IFN γ), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, fracktalquina, e IL-5, y/o factor de necrosis tumoral alfa (TNF α)), o un cambio máximo del pliegue, por ejemplo, de al menos en o aproximadamente 250 de al menos una de dichas citoquinas; y/o al menos un signo clínico de toxicidad, como hipotensión (por ejemplo, medida por al menos un presor vasoactivo intravenoso); hipoxia (p. ej., niveles de oxígeno plasmático (PO_2) inferiores a al menos 90%); y/o uno o más trastornos neurológicos (incluidos cambios del estado mental, obnubilación y convulsiones). En algunas divulgaciones, el CRS grave incluye el CRS que requiere tratamiento o cuidados en la unidad de cuidados intensivos (ICU).

[0054] En algunas divulgaciones, el CRS grave abarca una combinación de (1) fiebre persistente (fiebre de al menos 38 grados Celsius durante al menos tres días) y (2) un nivel sérico de PCR de al menos o aproximadamente 20 mg/dL. En algunas divulgaciones, el CRS grave abarca la hipotensión que requiere el uso de dos o más vasopresores o la insuficiencia respiratoria que requiere ventilación mecánica. En algunas divulgaciones, la dosis de vasopresores se aumenta en una segunda o posterior administración.

[0055] En algunas divulgaciones, el CRS grave o de grado 3 comprende un aumento de la alanina aminotransferasa, un aumento de la aspartato aminotransferasa, escalofríos, neutropenia febril, cefalea, disfunción ventricular izquierda, encefalopatía, hidrocefalia y/o temblor.

[0056] En algunas divulgaciones, el resultado tóxico de una terapia, tal como una terapia celular, es o está asociado con o es indicativo de neurotoxicidad o neurotoxicidad severa. En algunas divulgaciones, los síntomas asociados con un riesgo clínico de neurotoxicidad incluyen confusión, delirio, afasia expresiva, obnubilación, mioclonía, letargo, alteración del estado mental, convulsiones, actividad similar a las convulsiones, convulsiones (opcionalmente confirmadas por electroencefalograma [EEG]), niveles elevados de beta amiloide ($A\beta$), niveles elevados de glutamato y niveles elevados de radicales de oxígeno. En algunas divulgaciones, la neurotoxicidad se clasifica en función de la gravedad (por ejemplo, utilizando una escala de Grado 1-5 (véase, por ejemplo, Guido Cavaletti & Paola Marmioli); National Cancer Institute-Common Toxicity Criteria version 4.03 (NCI-CTCAE v4.03).

[0057] En algunos casos descritos aquí, los síntomas neurológicos pueden ser los síntomas más tempranos del sCRS. En algunas publicaciones, se observa que los síntomas neurológicos comienzan entre 5 y 7 días después de la infusión de terapia celular. En algunas divulgaciones, la duración de los cambios neurológicos puede oscilar entre 3 y 19 días. En algunos casos, la recuperación de los cambios neurológicos se produce después de que se hayan resuelto otros síntomas del sCRS. En algunas divulgaciones, el tiempo o el grado de resolución de los cambios neurológicos no se acelera con el tratamiento con anti-IL-6 y/o esteroide(s).

[0058] En algunas divulgaciones, se considera que un sujeto desarrolla "neurotoxicidad grave" en respuesta a o secundaria a la administración de una terapia celular o dosis de células de la misma, si, tras la administración, el sujeto muestra síntomas que limitan el autocuidado (por ejemplo, bañarse, vestirse y desvestirse, alimentarse, ir al baño, tomar medicamentos) de entre: 1) Síntomas de neuropatía motora periférica, incluida la inflamación o degeneración de los nervios motores periféricos; 2) síntomas de neuropatía sensorial periférica, incluida la inflamación o degeneración de los nervios sensoriales periféricos, disestesia, como distorsión de la percepción sensorial, que da lugar a una sensación anormal y desagradable, neuralgia, como sensación dolorosa intensa a lo largo de un nervio o un grupo de nervios, y/o parestesia, como alteraciones funcionales de las neuronas sensoriales que dan lugar a sensaciones cutáneas anormales de hormigueo, entumecimiento, presión, frío y calor en ausencia de estímulo. En algunas divulgaciones, la neurotoxicidad grave incluye la neurotoxicidad con un grado de 3 o superior, tal como se establece en la Tabla 2. En algunas divulgaciones, se considera que una neurotoxicidad grave es de grado 3 prolongado si los síntomas o la neurotoxicidad de grado 3 duran 10 días o más. En algunas divulgaciones, una toxicidad, como una neurotoxicidad, como una neurotoxicidad de grado 3 o 4, se considera una neurotoxicidad prolongada (por ejemplo, neurotoxicidad prolongada de grado 3) si los síntomas de un grado dado, como neurotoxicidad de grado 3 o superior, están o han estado presentes

durante al menos 10 días o al menos unos 10 días o al menos 11 días o al menos unos 11 días o al menos 10-11 días o unos 10-11 días. La neurotoxicidad prolongada de grado 3 se asocia generalmente a neurotoxicidad de grado 3 que persiste durante más de 9 días, 8 días o 1 semana de media. En algunas divulgaciones, la neurotoxicidad de grado 3 no prolongada generalmente se asocia con síntomas de neurotoxicidad de grado 3 que no persisten durante más de o más de una media de 9 días, 8 días o 1 semana o, en algunos casos, menos como 6, 5, 4 o 3 días.

Tabla 2: Criterios de Clasificación Ejemplares para neurotoxicidad	
Grado	Descripción de los Síntomas
1 Asintomático o Leve	Síntomas leves o asintomáticos
2 Moderado	Presencia de síntomas que limitan las actividades instrumentales de la vida diaria (ADL), tal como preparar comidas, compra de comestibles o ropa, usar el teléfono, administrar dinero
3 Grave	Presencia de síntomas que limitan el autocuidado ADL, tal como bañarse, vestirse y desvestirse, alimentarse solo, usar el baño, tomar sus medicamentos
4 Mortal	Síntomas que son mortales, que requieren intervención urgente
5 Fatal	Muerte

[0059] En algunas divulgaciones, los casos aquí divulgados, incluyendo métodos de tratamiento, usos, artículos de fabricación, dosis unitarias, conducen a una reducción de los síntomas asociados con la neurotoxicidad después de la terapia celular en comparación con otras divulgaciones o métodos. Por ejemplo, los sujetos tratados según los métodos divulgados pueden tener síntomas reducidos de neurotoxicidad, como debilidad o entumecimiento de las extremidades, pérdida de memoria, visión y/o intelecto, comportamientos obsesivos y/o compulsivos incontrolables, delirios, dolor de cabeza, problemas cognitivos y de comportamiento, incluyendo pérdida de control motor, deterioro cognitivo y disfunción del sistema nervioso autónomo, y disfunción sexual, en comparación con los sujetos tratados por otros métodos. En algunas divulgaciones, los sujetos tratados según los métodos divulgados pueden tener síntomas reducidos asociados con neuropatía motora periférica, neuropatía sensorial periférica, disestesia, neuralgia o parestesia.

[0060] En algunas divulgaciones, los métodos reducen los resultados asociados con la neurotoxicidad incluyendo daños al sistema nervioso y/o cerebro, tales como la muerte de neuronas. En algunas divulgaciones, los métodos reducen el nivel de factores asociados con la neurotoxicidad, como el beta amiloide (A β), el glutamato y los radicales de oxígeno.

[0061] En algunas divulgaciones, los sujetos administrados con una o más dosis unitarias de una composición de células T terapéuticas divulgada, o una composición de células T terapéuticas que se libera para su administración de acuerdo con los métodos divulgados y/o que se dosifican de acuerdo con los métodos divulgados tienen una probabilidad reducida de desarrollar un evento adverso grave, tal como al menos una neurotoxicidad prolongada de grado 3, tal como una neurotoxicidad de grado 4 o 5. En algunas divulgaciones, los sujetos tratados según los casos aquí divulgados no desarrollan una neurotoxicidad o desarrollan un grado de neurotoxicidad que es menos grave que si el sujeto hubiera sido tratado por otros métodos o con otras composiciones de células T terapéuticas, incluyendo composiciones de células T terapéuticas no evaluadas de acuerdo con los métodos divulgados.

II. ATRIBUTOS DE LAS COMPOSICIONES CELULARES

[0062] Los métodos aquí divulgados se refieren a los atributos de las células en una composición terapéutica de células T. En algunas divulgaciones, los atributos, solos o en combinación, se correlacionan con un riesgo de desarrollar un evento adverso o toxicidad, como una toxicidad grave, como al menos una toxicidad prolongada de grado 3 o una toxicidad de grado 4 o 5. En algunas divulgaciones, el atributo es un fenotipo de las células de la composición, también denominado "A" en el presente documento, incluido un fenotipo indicativo de la actividad biológica de las células o de una población celular. En algunas divulgaciones, el atributo es una actividad dependiente del receptor recombinante, tal como una actividad específica del antígeno, también denominada "B" en el presente documento. En algunas divulgaciones, el atributo A y/o B de las células en una composición de células T se considera en relación con los métodos divulgados. En

algunas divulgaciones, se considera una función de un atributo A y B en relación con la determinación de un número objetivo de unidades de referencia (RU), tal como en relación con el suministro o la administración de una dosis unitaria de una composición terapéutica de células T. En algunas divulgaciones, se utiliza un valor umbral del atributo B, o un nivel de especificación inferior (LSL) y un nivel de especificación superior (USL) de B, para evaluar o determinar la seguridad o la probabilidad de seguridad de una composición terapéutica de células T, como en relación con un ensayo de potencia o un ensayo de liberación. Se divulgan varios métodos ejemplares en los que se consideran o evalúan los atributos A y B.

A. Fenotipos de las composiciones celulares

[0063] En algunas divulgaciones, el fenotipo "A" es la presencia o ausencia de una o más moléculas específicas, incluyendo moléculas de superficie y/o moléculas que pueden acumularse o ser producidas por las células o una subpoblación de células dentro de una composición de células T. En algunas divulgaciones, el fenotipo, directa o inversamente, indica o es indicativo de una actividad biológica de las células o de una población de células dentro de la composición de células T. En algunas divulgaciones, el fenotipo puede incluir la actividad celular, como la producción de un factor en respuesta a un estímulo. En ciertas divulgaciones, la evaluación de una composición celular se realiza para identificar, detectar o cuantificar un fenotipo de la composición celular. En divulgaciones particulares, se realiza una medición de una composición celular para identificar, detectar o cuantificar la presencia, ausencia, grado de expresión o nivel de una molécula específica

[0064] En algunas divulgaciones, el fenotipo es indicativo de la viabilidad de una célula. En algunas divulgaciones, el fenotipo es indicativo de ausencia de apoptosis, ausencia de etapas tempranas de apoptosis o ausencia de etapas tardías de apoptosis. En algunas divulgaciones, el fenotipo es la ausencia de un factor indicativo de ausencia de apoptosis, apoptosis temprana o etapas tardías o apoptosis. En algunas divulgaciones, el fenotipo es un fenotipo de una subpoblación o subconjunto de células T, como células T que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, células T CAR+) o células T CD8+, células T ingenuas o cierta subpoblación de células T de memoria o células T que muestran atributos similares a los de las células madre de memoria. En algunas divulgaciones, el fenotipo es un fenotipo de células que no están activadas y/o que carecen o son reducidas para o bajas para la expresión de uno o más marcadores de activación. En algunas divulgaciones, el fenotipo es un fenotipo de células que no están agotadas y/o que carecen o son reducidas para o bajas para la expresión de uno o más marcadores de agotamiento.

[0065] En algunas divulgaciones, el fenotipo se indica por la presencia, ausencia o nivel de expresión en una célula de una o más moléculas específicas, tales como ciertos marcadores de superficie indicativos del fenotipo, por ejemplo, proteínas de superficie, marcadores intracelulares indicativos del fenotipo o ácidos nucleicos indicativos del fenotipo u otras moléculas o factores indicativos del fenotipo. En algunas divulgaciones, el fenotipo es o comprende una expresión positiva o negativa de una o más moléculas específicas. En algunas divulgaciones, las moléculas específicas incluyen, pero no se limitan a, un marcador de superficie, por ejemplo, una glicoproteína de membrana o un receptor, un marcador asociado con la apoptosis o la viabilidad, o una molécula específica que indica el estado de una célula inmunitaria, por ejemplo, un marcador asociado con la activación, el agotamiento, o un fenotipo maduro o ingenuo. En algunas divulgaciones, se puede utilizar cualquier método conocido para evaluar o medir, contar y/o cuantificar células basándose en moléculas específicas para determinar el número de células del fenotipo.

[0066] En algunas divulgaciones, un fenotipo es o incluye una expresión positiva o negativa de una o más moléculas específicas en una célula. En algunas divulgaciones, la expresión positiva se indica mediante una cantidad detectable de la molécula específica en la célula. En ciertas divulgaciones, la cantidad detectable es cualquier cantidad detectada de la molécula específica en la célula. En divulgaciones particulares, la cantidad detectable es una cantidad mayor que un fondo, por ejemplo, tinción de fondo, señal, etc., en la célula. En ciertas divulgaciones, la expresión positiva es una cantidad de la molécula específica que es mayor que un umbral, por ejemplo, un umbral predeterminado. Asimismo, en divulgaciones particulares, una célula con expresión negativa de una molécula específica puede ser cualquier célula que no se haya determinado que tiene expresión positiva, o es una célula que carece de una cantidad detectable de la molécula específica o una cantidad detectable de la molécula específica por encima del fondo. En algunas divulgaciones, la célula tiene expresión negativa de una molécula específica si la cantidad de la molécula específica está por debajo del umbral. Un experto en la materia entenderá cómo definir un umbral para definir la expresión positiva y/o negativa para una molécula específica como una cuestión de habilidad rutinaria, y que los umbrales pueden definirse de acuerdo con parámetros específicos, por ejemplo, pero no limitados al ensayo o método de detección, la identidad de la molécula específica, los reactivos utilizados para la detección y la instrumentación.

[0067] Los ejemplos de métodos que pueden utilizarse para detectar una molécula específica y/o analizar un fenotipo de las células incluyen, entre otros, análisis bioquímicos; análisis inmunoquímicos; análisis de imágenes; análisis citomorfológicos; análisis de moléculas como PCR, secuenciación, determinación de la metilación del ADN; análisis proteómicos como la determinación del patrón de glicosilación y/o fosforilación de proteínas; análisis genómicos; análisis epigenómicos; análisis transcriptómicos; y cualquier combinación de los mismos. En algunas divulgaciones, las características moleculares del fenotipo analizado por análisis de imagen, PCR (incluyendo el estándar y todas las variantes de PCR), microarrays (incluyendo, pero no limitado a microarrays de ADN, MMchips para microARN, microarrays de proteínas, microarrays celulares, microarrays de anticuerpos, y array de carbohidratos), secuenciación, detección de biomarcadores, o métodos para determinar la metilación del ADN o el patrón de glicosilación de proteínas. En

determinadas divulgaciones, la molécula específica es un polipéptido, es decir, una proteína. En algunas divulgaciones, la molécula específica es un polinucleótido.

[0068] En algunas divulgaciones, la expresión positiva o negativa de una molécula específica se determina incubando células con uno o más anticuerpos u otro agente de unión que se unen específicamente a uno o más marcadores de superficie expresados o expresados (marcador⁺) a un nivel relativamente más alto (marcador^{high}) en las células seleccionadas positiva o negativamente, respectivamente. En determinadas divulgaciones, la expresión positiva o negativa se determina mediante citometría de flujo, inmunohistoquímica o cualquier otro método adecuado para detectar marcadores específicos.

[0069] En divulgaciones particulares, la expresión de una molécula específica se evalúa con citometría de flujo. La citometría de flujo es una tecnología biofísica basada en láser o impedancia que se emplea en el recuento de células, la clasificación celular, la detección de biomarcadores y la ingeniería de proteínas, mediante la suspensión de células en una corriente de fluido y su paso por un aparato electrónico de detección. Permite el análisis multiparamétrico simultáneo de las características físicas y químicas de hasta miles de partículas por segundo.

[0070] Los datos generados por los citómetros de flujo pueden representarse en una sola dimensión, para producir un histograma, o en gráficos de puntos bidimensionales o incluso en tres dimensiones. Las regiones de estos gráficos pueden separarse secuencialmente, en función de la intensidad de fluorescencia, creando una serie de extracciones de subconjuntos, denominadas "puertas". Existen protocolos específicos de gating para fines diagnósticos y clínicos, especialmente en relación con la inmunología. Los gráficos suelen hacerse en escalas logarítmicas. Dado que los espectros de emisión de los distintos tintes fluorescentes se solapan, las señales en los detectores deben compensarse electrónicamente y computacionalmente. Los datos acumulados utilizando el citómetro de flujo pueden analizarse utilizando software, por ejemplo, JMP (software estadístico), WinMDI,[10] Flowing Software,[11] y Cytobank[12] basado en web), Cellcion, FCS Express, FlowJo, FACSDiva, CytoPaint (alias Paint-A-Gate),[13] Venturi One, CellQuest Pro, Infinicyt o Cytospec.

[0071] La citometría de flujo es una técnica estándar en la técnica y un experto comprendería fácilmente cómo diseñar o adaptar protocolos para detectar una o más moléculas específicas y analizar los datos para determinar la expresión de una o más moléculas específicas en una población de células. Los protocolos y técnicas estándar para la citometría de flujo se encuentran en Loyd "Flow Cytometry in Microbiology; Practical Flow Cytometry by Howard M. Shapiro; Flow Cytometry for Biotechnology by Larry A. Sklar, Handbook of Flow Cytometry Methods by J. Paul Robinson, et al., Current Protocols in Cytometry, Wiley-Liss Pub, Flow Cytometry in Clinical Diagnosis, v4, (Carey, McCoy, and Keren, eds), ASCP Press, 2007, Ormerod, M.G. (ed.) (2000) Flow Cytometry -A practical approach. 3ª edición. Oxford University Press, Oxford, UK, Ormerod, M.G. (1999) Flow Cytometry. 2ª edición. BIOS Scientific Publishers, Oxford., and Flow Cytometry - A basic introduction. Michael G. Ormerod, 2008.

[0072] En algunas divulgaciones, las células se clasifican por fenotipo para su posterior análisis. En algunas divulgaciones, las células de diferentes fenotipos dentro de la misma composición celular se clasifican mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). FACS es un tipo especializado de citometría de flujo que permite clasificar una mezcla heterogénea de células en dos o más contenedores, una célula cada vez, basándose en las características específicas de dispersión de la luz y fluorescencia de cada célula. Se trata de un instrumento científico útil, ya que proporciona un registro rápido, objetivo y cuantitativo de las señales fluorescentes de células individuales, así como la separación física de células de interés particular.

[0073] En algunas divulgaciones, el fenotipo incluye el número de células T totales o el número de células T CD3⁺ totales. En divulgaciones particulares, una composición de células T, por ejemplo, una composición de células T terapéuticas que contiene células que expresan un receptor recombinante o un CAR, puede incluir uno o más subtipos diferentes de células T. En algunas divulgaciones, el fenotipo es o incluye la identidad de un subtipo de células T. Las diferentes poblaciones o subtipos de células T incluyen, entre otras, las células T efectoras, las células T ayudantes, las células T de memoria, las células T reguladoras, las células T CD4⁺ y las células T CD8⁺. En ciertas divulgaciones, un subtipo de célula T puede identificarse detectando la presencia o ausencia de una molécula específica. En ciertas divulgaciones, la molécula específica es un marcador de superficie que puede utilizarse para identificar un subtipo de célula T.

[0074] En algunas divulgaciones, el fenotipo es la expresión positiva o de alto nivel de una o más moléculas específicas que son marcadores de superficie, por ejemplo, CD3, CD4, CD8, CD28, CD62L, CCR7, CD27, CD127, CD45RA, y/o CD45RO. En ciertas divulgaciones, el fenotipo es marcador de superficie de células T o de una subpoblación o subconjunto de células T, tal como basado en la expresión positiva de uno o más marcadores de superficie, por ejemplo, CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD28⁺, CD62L⁺, CCR7⁺, CD27⁺, CD127⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺, y/o CD45RO⁺.

[0075] En ciertas divulgaciones, el marcador de superficie indica la expresión de un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR. En divulgaciones particulares, el marcador de superficie es la expresión del receptor recombinante, por ejemplo CAR, que, en algunas divulgaciones, puede determinarse utilizando un anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-idiotipo. En algunas divulgaciones, el marcador de superficie que indica la expresión del receptor recombinante es un marcador sustituto. En algunas divulgaciones, el marcador sustitutivo es una proteína que se hace coexpresar en la superficie celular con el receptor recombinante, por ejemplo CAR. En divulgaciones particulares, dicho marcador sustituto es una proteína

de superficie que ha sido modificada para tener poca o ninguna actividad. En ciertas divulgaciones, el marcador sustitutivo se codifica en el mismo polinucleótido que codifica el receptor recombinante que se utiliza para la transducción. Un ejemplo no limitativo de marcador sustitutivo incluye, entre otros, un EGFR truncado (EGFRt), un HER2 truncado (tHER2) o un antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) o una forma modificada del mismo. En algunas divulgaciones, el marcador, por ejemplo, marcador sustituto, incluye todo o parte (por ejemplo, forma truncada) de CD34, un NGFR, un CD19 o un CD19 truncado, por ejemplo, un CD19 no humano truncado, o receptor del factor de crecimiento epidérmico (p. ej., tEGFR). En ciertas divulgaciones, una célula que tiene una cantidad detectable de CAR tiene un fenotipo que es o incluye CAR+. En determinadas divulgaciones, una célula que tiene una cantidad detectable de un marcador sustitutivo tiene un fenotipo que es o incluye CAR+.

[0076] En ciertas divulgaciones, el fenotipo comprende la expresión, por ejemplo de superficie, de uno o más de los marcadores de superficie CD3, CD4, CD8, y/o un receptor recombinante (por ejemplo CAR) o su marcador sustituto que indica o se correlaciona con la expresión de un receptor recombinante (por ejemplo CAR).

[0077] En divulgaciones particulares, el fenotipo se identifica por la expresión de una o más moléculas específicas que son marcadores de superficie. En ciertas divulgaciones, el fenotipo es o incluye la expresión positiva o negativa de CD3, CD4, CD8 y/o un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR. En ciertas divulgaciones, el receptor recombinante es un CAR. En divulgaciones particulares el fenotipo comprende CD3+/CAR+, CD4+/CAR+, y/o CD8+/CAR+.

[0078] En algunas divulgaciones, el fenotipo es la viabilidad. En ciertas divulgaciones, el fenotipo es la expresión positiva de un marcador que indica que la célula experimenta procesos celulares funcionales normales y/o no ha sufrido o no está en proceso de sufrir necrosis o muerte celular programada. En algunas divulgaciones, la viabilidad puede evaluarse mediante el potencial redox de la célula, la integridad de la membrana celular o la actividad o función de las mitocondrias. En algunas divulgaciones, la viabilidad es la ausencia de una molécula específica asociada con la muerte celular, o la ausencia de la indicación de muerte celular en un ensayo.

[0079] En algunas divulgaciones, el fenotipo es o comprende la viabilidad celular. En ciertas divulgaciones, la viabilidad de las células puede detectarse, medirse y/o evaluarse por una serie de medios que son rutinarios en la técnica. Ejemplos no limitantes de tales ensayos de viabilidad incluyen, pero no se limitan a, ensayos de absorción de colorantes (por ejemplo, ensayos de calceína AM), ensayos de viabilidad celular XTT y ensayos de exclusión de colorantes (por ejemplo, ensayos de exclusión de azul tripán, eosina o propidio). Los ensayos de viabilidad son útiles para determinar el número o porcentaje (por ejemplo, frecuencia) de células viables en una dosis celular, una composición celular y/o una muestra celular. En divulgaciones particulares, el fenotipo comprende la viabilidad celular junto con otras características, por ejemplo, la expresión del receptor recombinante.

[0080] En ciertas divulgaciones, el fenotipo es o incluye viabilidad celular, CD3+ viable, CD4+ viable, CD8+ viable, CD3+/CAR+ viable, CD4+/CAR+ viable, CD8+/CAR+ viable, o una combinación de los mismos.

[0081] En divulgaciones particulares, el fenotipo es o incluye una ausencia de apoptosis y/o una indicación de que la célula está experimentando el proceso apoptótico. La apoptosis es un proceso de muerte celular programada que incluye una serie de acontecimientos morfológicos y bioquímicos estereotipados que conducen a cambios celulares característicos y a la muerte. Estos cambios incluyen la formación de burbujas, el encogimiento celular, la fragmentación nuclear, la condensación de la cromatina, la fragmentación del ADN cromosómico y el decaimiento global del ARNm. La apoptosis es un proceso bien caracterizado, y las moléculas específicas asociadas a las distintas etapas son bien conocidas en la técnica.

[0082] En algunas divulgaciones, el fenotipo es la ausencia de una etapa temprana de apoptosis, y/o la ausencia de un indicador y/o una molécula específica asociada con una etapa temprana de apoptosis. En las primeras fases de la apoptosis, se aprecian cambios en la membrana celular y mitocondrial. También se observan cambios bioquímicos en el citoplasma y el núcleo de la célula. Por ejemplo, los estadios iniciales de la apoptosis pueden indicarse por la activación de determinadas caspasas, por ejemplo, 2, 8, 9 y 10. En divulgaciones particulares, el fenotipo es la ausencia de una etapa tardía de apoptosis, y/o una ausencia de un indicador y/o una molécula específica asociada con una etapa tardía de apoptosis. Las fases media y tardía de la apoptosis se caracterizan por una mayor pérdida de integridad de la membrana, condensación de la cromatina y fragmentación del ADN, e incluyen acontecimientos bioquímicos como la activación de las caspasas 3, 6 y 7.

[0083] En divulgaciones particulares, el fenotipo es la expresión negativa de uno o más factores asociados con la muerte celular programada. En ciertas divulgaciones, el fenotipo es la expresión negativa de uno o más factores asociados con la apoptosis, incluidos factores proapoptóticos conocidos por iniciar la apoptosis, por ejemplo, miembros de la vía del receptor de muerte, miembros activados de la vía mitocondrial (intrínseca), como miembros de la familia Bcl-2, por ejemplo, Bax, Bad y Bid, y caspasas. En algunas divulgaciones, el fenotipo es una cantidad negativa o baja de un marcador de apoptosis. En ciertas divulgaciones, el fenotipo es la expresión negativa de un marcador de apoptosis. En ciertas divulgaciones, el fenotipo es la ausencia de un indicador, por ejemplo, una molécula Anexina V, que se unirá preferentemente a las células en apoptosis cuando se incuban con una composición celular o se pone en contacto con ella. En algunas divulgaciones, el fenotipo es o incluye la expresión de uno o más marcadores que son indicativos de un estado apoptótico en la célula.

- 5 **[0084]** En algunas divulgaciones, el fenotipo es la expresión negativa (o baja) de una molécula específica que es un marcador de apoptosis. Los expertos en la materia conocen varios marcadores de apoptosis e incluyen, entre otros, un aumento de la actividad de una o más caspasas, es decir, una caspasa activada, un aumento de la escisión de PARP, la activación y/o translocación de proteínas de la familia Bcl-2, miembros de la vía de la muerte celular, por ejemplo Fas y FADD, Fas y FADD, presencia de contracción nuclear (p. ej., monitorizada por microscopio) y presencia de fragmentación del ADN cromosómico (p. ej., presencia de escalera de ADN cromosómico) o con ensayos de apoptosis que incluyan tinción TUNEL, y tinción de Anexina V.
- 10 **[0085]** Las caspasas son enzimas que escinden proteínas después de un residuo de ácido aspártico, el término deriva de "cisteína-ácido aspártico proteasas". Las caspasas están implicadas en la apoptosis, por lo que la activación de caspasas, como la caspasa-3, es indicativa de un aumento o reactivación de la apoptosis. En ciertas divulgaciones, la activación de la caspasa puede detectarse mediante métodos conocidos por la persona con conocimientos ordinarios. En algunas divulgaciones, se puede utilizar un anticuerpo que se une específicamente a una caspasa activada (es decir, se une específicamente al polipéptido escindido) para detectar la activación de la caspasa. En otra divulgación, puede utilizarse un ensayo de inhibidor fluorocromo de la actividad caspasa (FLICA) para detectar la activación de la caspasa-3 detectando la hidrólisis de acetil Asp-Glu-Val-Asp 7-amido-4-metilcumarina (Ac-DEVD-AMC) por la caspasa-3 (es decir, detectando la liberación de la 7-amino-4-metilcumarina fluorescente (AMC)). Los ensayos FLICA pueden utilizarse para determinar la activación de caspasas mediante la detección del producto de un sustrato procesado por múltiples caspasas (por ejemplo, FAM-VAD-FMK FLICA). Otras técnicas incluyen Los ensayos de caspasas CASPASE-GLO® (PROMEGA) que utilizan el sustrato luminogénico de tetrapéptido de caspasa-8 (Z-LETD-aminoluciferina), el sustrato de tetrapéptido de caspasa-9 (Z-LEHD-aminoluciferina), el sustrato de caspasa-3/7 (Z-DEVD-aminoluciferina), el sustrato de caspasa-6 (Z-VEID-aminoluciferina) o el sustrato de caspasa-2 (Z-VDVAD-aminoluciferina).
- 20 **[0086]** En ciertas divulgaciones, el fenotipo es o incluye expresión negativa de caspasa-1 activa, caspasa-2 activa, caspasa-3 activa, caspasa-7 activa, caspasa-8 activa, caspasa-9 activa, caspasa-10 activa y/o caspasa-13 activa en una célula. En divulgaciones particulares, el fenotipo es o incluye caspasa 3- activa. En algunas divulgaciones, la forma proforma (zimógeno escindido) de una caspasa, como cualquiera de las anteriores, también es un marcador que indica la presencia de apoptosis. En algunas divulgaciones, el fenotipo es o incluye la ausencia o expresión negativa de una proforma de una caspasa, como la proforma de la caspasa-3.
- 25 **[0087]** En algunas divulgaciones, el marcador de apoptosis es la poli ADP-ribosa polimerasa 1 (PARP) escindida. La PARP es escindida por la caspasa durante las primeras fases de la apoptosis. Así, la detección de un péptido PARP escindido es un marcador de apoptosis. En determinadas divulgaciones, el fenotipo es o incluye la expresión positiva o negativa de PARP escindida.
- 30 **[0088]** En algunas divulgaciones, el marcador de apoptosis es un reactivo que detecta una característica en una célula que está asociada con la apoptosis. En ciertas divulgaciones, el reactivo es una molécula de anexina V. Durante las primeras fases de la apoptosis, el lípido fosfatidilserina (PS) se desplaza de la lámina interna a la externa de la membrana plasmática. La PS se limita normalmente a la membrana interna en las células sanas y/o no apoptóticas. La anexina V es una proteína que se une preferentemente a la fosfatidilserina (PS) con gran afinidad. Cuando se conjuga con una marcación fluorescente u otro indicador, la anexina V puede utilizarse para detectar rápidamente este indicador temprano de apoptosis en la superficie celular. En algunas divulgaciones, la presencia de PS en la membrana externa persistirá en las últimas fases de la apoptosis. Así, en algunas divulgaciones, la tinción con anexina V es una indicación tanto de las fases tempranas como tardías de la apoptosis. En ciertas divulgaciones, una Anexina, por ejemplo Anexina V, se marca con una marcación detectable y se incuba con, se expone a, y/o se pone en contacto con células de una composición celular para detectar células que están sufriendo apoptosis, por ejemplo por citometría de flujo. En algunas divulgaciones, las anexinas marcadas con fluorescencia, por ejemplo, anexina V, se utilizan para teñir células para análisis de citometría de flujo, por ejemplo con el ensayo anexina-V/7-AAD. Protocolos alternativos adecuados para la detección de apoptosis con anexina incluyen técnicas y ensayos que utilizan anexina V radiomarcada. En ciertas divulgaciones, el fenotipo es o incluye tinción negativa por anexina, por ejemplo anexina V-. En determinadas divulgaciones, el fenotipo es o incluye la ausencia de PS en la membrana plasmática externa. En ciertas divulgaciones, el fenotipo es o incluye células que no están unidas por anexina, por ejemplo, anexina V. En ciertas divulgaciones, la célula que carece de PS detectable en la membrana externa es anexina V-. En divulgaciones particulares, la célula que no está unida por anexina V- en un ensayo, por ejemplo, citometría de flujo después de la incubación con anexina V marcada, es anexina V-.
- 40 **[0089]** En divulgaciones particulares, el fenotipo es anexina V-, anexina V- CD3+, anexina V-CD4+, anexina V- CD8+, anexina V-CD3+/CAR+, anexina V- CD4+/CAR+, anexina V-CD8+/CAR+, caspasa 3- activada, caspasa activada 3-/CD3+, caspasa activada 3-/CD4+, caspasa activada 3-/CD8+, caspasa activada 3-/CD3+/CAR+, caspasa activada 3-/CD4+/CAR+, caspasa activada 3-/CD8+/CAR+, o una combinación de las mismas.
- 50 **[0090]** Las divulgaciones particulares contemplan que las células positivas para la expresión de un marcador de apoptosis están experimentando muerte celular programada, muestran función inmune reducida o nula, y tienen capacidades disminuidas, si las hay, para experimentar activación, expansión y/o unirse a un antígeno para iniciar, realizar o contribuir a una respuesta o actividad inmune. En determinadas divulgaciones, el fenotipo se define por la expresión negativa de una caspasa activada y/o la tinción negativa con anexina V.
- 60

[0091] En ciertas divulgaciones, el fenotipo es o incluye caspasa 3- activada (caspasa 3-) y/o anexina V-.

[0092] En ciertas divulgaciones, el fenotipo es la expresión negativa de uno o más factores asociados con la muerte celular inflamatoria. En algunas divulgaciones, la muerte celular inflamatoria es la piroptosis. En divulgaciones particulares, la piroptosis ocurre o puede ocurrir potencialmente en células infectadas viralmente y/o transducidas, por ejemplo, células T CD4+ y/o CD8+ infectadas viralmente y/o transducidas. En algunas divulgaciones, la piroptosis está o puede estar asociada con una o más de las siguientes: lisis celular, hinchazón celular, formación de poros, fragmentación del ADN y/o activación de la caspasa-1. En ciertas divulgaciones, la piroptosis no da como resultado el sangrado de la membrana, la activación de la caspasa-3 y/o la liberación de citocromo-C.

[0093] En algunas divulgaciones, el uno o más factores asociados con la piroptosis es o incluye receptores de reconocimiento de patrones, inflamasomas, caspasa-1 activa, IL-1b activa, y/o IL-18 activa. En algunas divulgaciones, el uno o más factores es o incluye receptores de patrones activados y/o ligados. En divulgaciones particulares, el uno o más factores es o incluye TLR activado y/o ligado, receptores similares a NOD, RIG-I, MDA5, y/o STING. En algunas divulgaciones, el uno o más factores es o incluye IL-1b activa. En divulgaciones particulares, el uno o más factores es o incluye IL-18 activa. En ciertas divulgaciones, el uno o más factores es o incluye caspasa-1 activa.

[0094] En ciertas divulgaciones, el fenotipo es o incluye caspasa-1- activada (caspasa-1-). En algunas divulgaciones, el fenotipo es o incluye IL-1b- activa. En divulgaciones particulares, el fenotipo es o incluye IL-18- activa.

[0095] En divulgaciones particulares, la muerte celular inflamatoria es o incluye necroptosis. En ciertas divulgaciones, el fenotipo es la expresión negativa de uno o más factores asociados a la necroptosis. En algunas divulgaciones, la necroptosis es una muerte celular necrótica programada impulsada por la activación de la familia de cinasas RIP. En algunas divulgaciones, la necroptosis se produce o puede producirse tras la unión y/o activación de receptores de la familia TNF y/o tras la participación de receptores de reconocimiento de patrones (es decir, componentes virales que se unen a RIG-I/MDA5 o vías relacionadas). En algunas divulgaciones, la producción de TNF α durante la infección viral conduce a la estimulación de su receptor TNFR1, la activación de la proteína de la muerte asociada a TNFR TRADD que a su vez activa RIPK1 para reclutar RIPK3 para formar un necrosoma. En algunas divulgaciones, la formación del necrosoma da lugar a la fosforilación de MLKL y a la oligomerización de MLKL, lo que permite a MLKL insertarse en membranas plasmáticas y orgánulos y permeabilizarlos. En algunas divulgaciones, la integración de MLKL conduce al fenotipo inflamatorio y a la liberación de patrones moleculares asociados a daños (DAMP), que provocan respuestas inmunitarias.

[0096] En algunas divulgaciones, uno o más factores asociados con la necroptosis son receptores de reconocimiento de patrones activados y/o ligados, por ejemplo, RIG-I/MDA5 activado y/o ligado, TNFR1 activado, TRADD, un necrosoma y/o MLKL fosforilado y/o oligomerizado. En algunas divulgaciones, el uno o más factores asociados con la necroptosis es o incluye la quinasa RIP activada, por ejemplo, RIPK1, RIPK2, RIPK3, RIPK4, y/o RIPK5. En algunas divulgaciones, el uno o más factores es RIPK1 activado y/o RIPK3. En algunas divulgaciones, el fenotipo es o incluye RIPK1- activado, RIPK3- activado, MLKL- fosforilado y/o MLKL- oligomerizado.

[0097] En divulgaciones particulares, el fenotipo es la expresión negativa de uno o más factores asociados a la autofagia. En algunas divulgaciones, la autofagia es o incluye un mecanismo catabólico intrínseco de la célula que ocurre y/o puede ocurrir bajo ciertas condiciones de cultivo celular, por ejemplo, condiciones en las que los nutrientes críticos son limitados y/o en respuesta a ciertas citoquinas. En algunas divulgaciones, la autofagia se produce independientemente de la actividad de las caspasas.

[0098] En algunas divulgaciones, la autofagia es macroautofagia, microautofagia y/o autofagia mediada por chaperonas. En algunas divulgaciones, uno o más factores asociados con el marcador de autofagia incluyen AMPK, ULK1, ULK2 y/u otros miembros de la familia Atg (por ejemplo, ATG16L), PIK3C3, BECN1, Vps34, Beclin-1, MAP1LC3A,B,C, GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2, UVRAG, IRGM, CLN3, Parkin, p62 y LAMP2 y/u otros factores conocidos como los descritos en Behrends, Nature. 2010 and Glick et al. J Pathol. 2010 May;221(1):3-12. En algunas divulgaciones, el fenotipo es AMPK-, ULK1-, ULK2-, PIK3C3-, BECN1-, Vps34-, Beclin-1-, MAP1LC3A-, MAP1LC3B-, MAP1LC3C-, GABARAP-, GABARAPL1-, GABARAPL2-, UVRAG-, IRGM-, CLN3-, Parkin-, p62-, y/o LAMP2-.

[0099] Entre los fenotipos se encuentra la expresión o expresión superficial de uno o más marcadores generalmente asociados con uno o más subtipos o subpoblaciones de células T, o fenotipos de los mismos. Los subtipos y subpoblaciones de células T pueden incluir células T CD4+ y/o de CD8+ y subtipos de las mismas que pueden incluir células T ingenuas (T_N), células T efectoras (T_{EFF}), células T de memoria y subtipos de las mismas, como células T de memoria de células madre (T_{SCM}), células T de memoria central (T_{CM}), células T de memoria efectoras (T_{EM}), células T_{EMRA} o células T de memoria efectoras terminalmente diferenciadas, linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), células T inmaduras, células T maduras, células T auxiliares, células T citotóxicas, células T invariantes asociadas a mucosas (MAIT), células T reguladoras (Treg) naturales y adaptativas, células T auxiliares, como células TH1, células TH2, células TH3, células TH17, células TH9, células TH22, células T auxiliares foliculares, células T alfa/beta y células T delta/gamma.

[0100] En algunas divulgaciones, el fenotipo es o incluye un fenotipo de una célula T de memoria o subconjunto de células

T de memoria. Las células T de memoria son células T específicas de antígeno que han sido expuestas previamente a su antígeno correspondiente. Las células T de memoria persisten a largo plazo tras la resolución de una infección. Las células T de memoria se expanden rápidamente hasta convertirse en un gran número de células T efectoras al volver a exponerse a su antígeno correspondiente, proporcionando así al sistema inmunitario "memoria" frente a infecciones pasadas. Las células T de memoria comprenden tres subtipos: células T de memoria central (células T_{CM}) y dos tipos de células T de memoria efectoras (células T_{EM} y células T_{EMRA}). En algunas divulgaciones, el fenotipo es o incluye un fenotipo de una célula T de memoria (o uno o más marcadores asociados a la misma), como una célula T_{CM}, una célula T_{EM} o una célula T_{EMRA}, una célula T madre de memoria (T_{SCM}) o una combinación de las mismas. En divulgaciones particulares, el fenotipo es o incluye la expresión de una o más moléculas específicas que es un marcador para células T de memoria y/o memoria o subtipos de las mismas.

[0101] En divulgaciones particulares, el fenotipo es o incluye la expresión de una o más moléculas específicas que es un marcador de células T ingenuas. Las células T ingenuas incluyen células T nuevas que se han producido en la médula ósea y son capaces de responder a patógenos recién encontrados que contienen antígenos que el sistema inmunitario no ha procesado antes. Tras la estimulación por su antígeno afín, una parte de las células T ingenuas activadas se convertirán en células de memoria.

[0102] En algunas divulgaciones, el fenotipo es o incluye una célula T de memoria o una célula T ingenua. En ciertas divulgaciones, el fenotipo es la expresión positiva o negativa de una o más moléculas específicas que son marcadores de memoria. En algunas divulgaciones, el marcador de memoria es una molécula específica que puede utilizarse para definir una población de células T de memoria.

[0103] En algunas divulgaciones, el fenotipo es o incluye un fenotipo de o uno o más marcador(es) asociado(s) con una célula T no memoria o subtipo de la misma; en algunas divulgaciones, es o incluye un fenotipo o marcador(es) asociado(s) con una célula ingenua. En algunas divulgaciones, el fenotipo es CCR7⁺/CD27⁺/CD28⁺/CD45RA⁺. En ciertas divulgaciones, el fenotipo es o incluye CCR7⁺/CD45RA⁺. En algunas divulgaciones, el fenotipo es o incluye un fenotipo de célula T de memoria central. En determinadas divulgaciones, el fenotipo es o incluye CCR7⁺/CD27⁺/CD28⁺/CD45RA⁺. En algunas divulgaciones, el fenotipo es o incluye una célula efectora de memoria. En algunas divulgaciones, el fenotipo es o incluye CCR7⁺/CD27⁺/CD28⁺/CD45RA⁺. En ciertas divulgaciones, el fenotipo es o incluye el de una célula T_{EMRA} o una célula T_{SCM}. En ciertas divulgaciones, el fenotipo es o incluye CD45RA⁺. En determinadas divulgaciones, el fenotipo es o incluye CCR7⁺/CD27⁺/CD28⁺/CD45RA⁺. En algunas divulgaciones, el fenotipo es o incluye uno de CD27⁺/CD28⁺, CD27⁺/CD28⁺, CD27⁺/CD28⁺, o CD27⁺/CD28⁺.

[0104] En algunas divulgaciones, el fenotipo es o incluye cualquiera de las propiedades fenotípicas anteriores e incluye además la expresión de un receptor recombinante, como el fenotipo asociado con una célula T de memoria o subtipo de memoria y que expresa un CAR, o un fenotipo asociado con una célula ingenua que expresa un CAR. En ciertas divulgaciones, el fenotipo es o incluye el de una célula T de memoria central o célula T madre de memoria central que expresa un CAR. En determinadas divulgaciones, el fenotipo es o incluye el de una célula efectora de memoria que expresa un CAR. En algunas divulgaciones, el fenotipo es o incluye el de una célula T_{EMRA} que expresa un CAR. En divulgaciones particulares, el fenotipo es o incluye CAR⁺/CCR7⁺/CD27⁺/CD28⁺/CD45RA⁺; CAR⁺/CCR7⁺/CD27⁺/CD28⁺/CD45RA⁺; CAR⁺/CCR7⁺/CD27⁺/CD28⁺/CD45RA⁺; CAR⁺/CCR7⁺/CD27⁺/CD28⁺/CD45RA⁺; CAR⁺/CD27⁺/CD28⁺; CAR⁺/CD27⁺/CD28⁺; o CAR⁺/CD27⁺/CD28⁺.

[0105] En ciertas divulgaciones, el fenotipo es o incluye un fenotipo de una célula T que es negativo para un marcador de apoptosis. En ciertas divulgaciones, el fenotipo es o incluye una célula ingenua que es negativa para un marcador de apoptosis. En algunas divulgaciones, el marcador de apoptosis es la caspasa 3 activada. En algunas divulgaciones, el marcador de apoptosis es la tinción positiva por anexina V.

[0106] En divulgaciones particulares, el fenotipo es o incluye el de una célula T de memoria o subtipo de la misma que es negativo para un marcador de apoptosis que expresa un CAR. En divulgaciones particulares, el fenotipo es o incluye el de una célula T de memoria o subtipo particular que es negativo para el marcador de apoptosis que expresa un CAR. En ciertas divulgaciones, el fenotipo es o incluye una célula ingenua que es negativa para un marcador de apoptosis que expresa un CAR. En ciertas divulgaciones, el fenotipo es o incluye el de una célula T de memoria central o célula T_{SCM} o célula ingenua que es negativa para un marcador de apoptosis que expresa un CAR. En divulgaciones particulares, el fenotipo es o incluye el de una célula efectora de memoria que es negativa para un marcador de apoptosis que expresa un CAR. En ciertas divulgaciones, el fenotipo es o incluye anexina V⁺/CAR⁺/CCR7⁺/CD27⁺/CD28⁺/CD45RA⁺; anexina V⁺/CAR⁺/CCR7⁺/CD27⁺/CD28⁺/CD45RA⁺; anexina V⁺/CAR⁺/CCR7⁺/CD27⁺/CD28⁺/CD45RA⁺; anexina V⁺/CAR⁺/CD27⁺/CD28⁺; anexina V⁺/CAR⁺/CD27⁺/CD28⁺; anexina V⁺/CAR⁺/CD27⁺/CD28⁺; o anexina V⁺/CAR⁺/CD27⁺/CD28⁺. En ciertas divulgaciones, el fenotipo es o incluye caspasa activada 3⁺/CAR⁺/CCR7⁺/CD27⁺/CD28⁺/CD45RA⁺; caspasa activada 3⁺/CAR⁺/CCR7⁺/CD27⁺/CD28⁺/CD45RA⁺; caspasa activada 3⁺/CAR⁺/CD27⁺/CD28⁺; caspasa activada 3⁺/CAR⁺/CD27⁺/CD28⁺; caspasa activada 3⁺/CAR⁺/CD27⁺/CD28⁺; or caspasa activada 3⁺/CAR⁺/CD27⁺/CD28⁺.

[0107] En algunas divulgaciones, el fenotipo es o incluye la expresión positiva o negativa de un marcador de agotamiento. El agotamiento de las células T es un estado de disfunción de las células T que surge durante muchas infecciones crónicas y cáncer. Se define por una función efectora deficiente, una expresión sostenida de receptores inhibidores y un estado

transcripcional distinto del de las células T efectoras funcionales o de memoria. El agotamiento impide un control óptimo de las infecciones y los tumores. En ciertas divulgaciones, el fenotipo es o incluye la expresión positiva o negativa de una molécula específica que se asocia con el agotamiento. En ciertas divulgaciones, la molécula específica es cualquier molécula que esté asociada con el agotamiento o una cualidad asociada con el agotamiento, por ejemplo, una función efectora deficiente o la expresión de un receptor inhibidor. En determinadas divulgaciones, el fenotipo es la expresión positiva o negativa de un inhibidor del punto de control inmunitario. En divulgaciones particulares, el marcador de agotamiento es CTLA-4, FOXP3, PD-1, TIGIT, LAB-3, 2B4, BTLA, TIM3, VISTA, o CD96, o una combinación de los mismos. En ciertas divulgaciones, el fenotipo es la expresión positiva o negativa de CTLA-4, FOXP3, PD-1, TIGIT, LAB-3, 2B4, BTLA, TIM3, VISTA, o CD96, o una combinación de los mismos. En determinadas divulgaciones, el fenotipo es la expresión positiva o negativa de PD1 y/o FOXP3.

[0108] En ciertas divulgaciones, el fenotipo es la expresión negativa de una molécula específica que se asocia con la activación de células T. En algunas divulgaciones, el fenotipo es o incluye la expresión negativa de una o más de una molécula específica que es un marcador de activación. La activación de células T se refiere a la provocación de una respuesta inmunitaria por parte de una célula T, tras la estimulación de esta última por parte de una célula presentadora de antígeno (APC). Esta vía interactiva explica las principales señales estimuladoras que desencadenan la activación de las células T, así como sus vías descendentes. En general, la activación de las células T requiere dos señales simultáneas. El primero es la unión del complejo receptor de células T (TCR) a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) portadora de un antígeno peptídico. El segundo lo proporciona la unión del receptor coestimulador CD28 a proteínas de la superficie de la APC, como B7-2 o B7-1. En ciertas divulgaciones, la molécula específica se asocia con la activación del TCR, por ejemplo, se activa, altera o expresa como resultado de la activación de células T. En algunas divulgaciones, la molécula específica está asociada con la activación de un receptor CD28, por ejemplo, una molécula que se activa, altera o expresa como resultado de la activación de células T.

[0109] En algunas divulgaciones, el fenotipo es o incluye la expresión positiva o negativa de un marcador de agotamiento. El agotamiento de las células T es un estado de disfunción de las células T que surge durante muchas infecciones crónicas y cáncer. Se define por una función efectora deficiente, una expresión sostenida de receptores inhibidores y un estado transcripcional distinto del de las células T efectoras funcionales o de memoria. El agotamiento impide un control óptimo de las infecciones y los tumores. En ciertas divulgaciones, el fenotipo es o incluye la expresión positiva o negativa de una molécula específica que se asocia con el agotamiento. En ciertas divulgaciones, la molécula específica es cualquier molécula que esté asociada con el agotamiento o una cualidad asociada con el agotamiento, por ejemplo, una función efectora deficiente o la expresión de un receptor inhibidor. En determinadas divulgaciones, el fenotipo es la expresión positiva o negativa de un inhibidor del punto de control inmunitario. En divulgaciones particulares, el marcador de agotamiento es CTLA-4, FOXP3, PD-1, TIGIT, LAB-3, 2B4, BTLA, TIM3, VISTA, o CD96, o una combinación de los mismos. En ciertas divulgaciones, el fenotipo es la expresión positiva o negativa de CTLA-4, FOXP3, PD-1, TIGIT, LAB-3, 2B4, BTLA, TIM3, VISTA, o CD96, o una combinación de los mismos. En determinadas divulgaciones, el fenotipo es la expresión positiva o negativa de PD1 y/o FOXP3.

[0110] En algunas divulgaciones, el fenotipo es o incluye la expresión positiva o negativa de un marcador de agotamiento en una célula CD3+ que expresa un receptor recombinante o un CAR. En divulgaciones particulares, el fenotipo es o incluye la expresión positiva o negativa de un marcador de agotamiento en una célula CD4+ que expresa un receptor recombinante o un CAR. En algunas divulgaciones, el fenotipo es o incluye expresión positiva o negativa de un marcador de agotamiento y CD3+ y expresión positiva de un receptor recombinante o un CAR. En divulgaciones particulares, el fenotipo es o incluye la expresión positiva o negativa de un marcador de agotamiento en una célula CD4+ que expresa un receptor recombinante o un CAR. En algunas divulgaciones, el fenotipo es o incluye la expresión positiva o negativa de un marcador de agotamiento en una célula CD8+ que expresa un receptor recombinante o un CAR. En divulgaciones particulares, el marcador de agotamiento es uno o más de CTLA-4, FOXP3, PD-1, TIGIT, LAB-3, 2B4, BTLA, TIM3, VISTA o CD96. En divulgaciones particulares, el marcador de agotamiento es PD1 y/o FOXP3.

[0111] En divulgaciones particulares, el fenotipo es o incluye PD1-/CD3+, PD1-/CD4+, PD1-/CD8+, PD1-/CD3+/CAR+, PD1-/CD4+/CAR+, PD1-/CD8+/CAR+, PD1-/anexina V-, PD1-/anexina V-/CD3+, PD1-/anexina V-/CD4+, PD1-/anexina V-/CD8+, PD1-/anexina V-/CD3+/CAR+, PD1-/anexina V-/CD4+/CAR+, PD1-/anexina V-/CD8+/CAR+, PD1-caspasa activada 3-, PD1-caspasa activada 3-/CD3+, PD1-caspasa activada 3-/CD4+, PD1-caspasa activada 3-/CD8+, PD1-caspasa activada 3-/CD3+/CAR+, PD1-caspasa activada 3-/CD4+/CAR+, PD1-caspasa activada 3-/CD8+/CAR+, o una combinación de las mismas.

[0112] En ciertas divulgaciones, el fenotipo es o incluye FOXP3-/CD3+, FOXP3-/CD4+, FOXP3-/CD8+, FOXP3-/CD3+/CAR+, FOXP3-/CD4+/CAR+, FOXP3-/CD8+/CAR+, FOXP3-/anexina V-, FOXP3-/anexina V-/CD3+, FOXP3-/anexina V-/CD4+, FOXP3-/anexina V-/CD8+, FOXP3-/anexina V-/CD3+/CAR+, FOXP3-/anexina V-/CD4+/CAR+, FOXP3-/anexina V-/CD8+/CAR+, FOXP3-/caspasa activada 3-, FOXP3-/caspasa activada 3-/CD3+, FOXP3-/caspasa activada 3-/CD4+, FOXP3-/caspasa activada 3-/CD8+, FOXP3-/caspasa activada 3-/CD3+/CAR+, FOXP3-/caspasa activada 3-/CD4+/CAR+, FOXP3-/caspasa activada 3-/CD8+/CAR+, o una combinación de las mismas.

[0113] En ciertas divulgaciones, el fenotipo es la expresión negativa de una molécula específica que está asociada con la activación de células T. En algunas divulgaciones, el fenotipo es o incluye la expresión negativa de una o más de una molécula específica que es un marcador de activación. La activación de células T se refiere a la provocación de una

respuesta inmunitaria por parte de una célula T, tras la estimulación de esta última por parte de una célula presentadora de antígeno (APC). Esta vía interactiva explica las principales señales estimuladoras que desencadenan la activación de las células T, así como sus vías descendentes. En general, la activación de las células T requiere dos señales simultáneas. El primero es la unión del complejo receptor de células T (TCR) a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) portadora de un antígeno peptídico. El segundo lo proporciona la unión del receptor coestimulador CD28 a proteínas de la superficie de la APC, como B7-2 o B7-1. En ciertas divulgaciones, la molécula específica se asocia con la activación del TCR, por ejemplo, se activa, altera o expresa como resultado de la activación de células T. En algunas divulgaciones, la molécula específica está asociada con la activación de un receptor CD28, por ejemplo, una molécula que se activa, altera o expresa como resultado de la activación de células T.

[0114] En divulgaciones particulares, el fenotipo es o incluye la expresión negativa de una o más de una molécula específica que es un marcador de activación. En ciertas divulgaciones, el marcador de activación es uno o más de CD25, CD26, CD27, CD28, CD30, CD71, CD154, CD40L, CD127, LAG3, Ki67, o una combinación de los mismos. En ciertas divulgaciones, el fenotipo es la expresión negativa o positiva de uno o más de CD25, CD26, CD27, CD28, CD30, CD71, CD154, CD40L, CD127, LAG3 o Ki67. En ciertas divulgaciones, el fenotipo es o incluye la expresión de CD25, CD127, LAG3, Ki67, o una combinación de los mismos.

[0115] En algunas divulgaciones, el fenotipo es o incluye la expresión positiva o negativa de un marcador de activación en una célula CD3+ que expresa un receptor recombinante o un CAR. En divulgaciones particulares, el fenotipo es o incluye la expresión positiva o negativa del marcador de activación en una célula CD4+ que expresa un receptor recombinante o un CAR. En algunas divulgaciones, el fenotipo es o incluye la expresión positiva o negativa del marcador de activación en una célula CD8+ que expresa un receptor recombinante o un CAR. En divulgaciones particulares, el marcador de activación es uno o más de CD25, CD26, CD27, CD28, CD30, CD71, CD154, CD40L, CD127, LAG3, o Ki67. En determinadas divulgaciones, el marcador de activación es CD25, CD127, LAG3, Ki67 o una combinación de los mismos.

[0116] En divulgaciones particulares, el fenotipo es o incluye expresión positiva o negativa de un marcador de activación y CD3+, CD4+, CD8+, CD3+/CAR+, CD4+/CAR+, CD8+/CAR+, anexina V-, anexina V-/CD3+, anexina V-/CD4+, anexina V-/CD8+, anexina V-/CD3+/CAR+, anexina V-/CD4+/CAR+, anexina V-/CD8+/CAR+, caspasa activada 3-, caspasa activada 3-/CD3+, caspasa activada 3-/CD4+, caspasa activada 3-/CD8+, caspasa activada 3-/CD3+/CAR+, caspasa activada 3-/CD4+/CAR+, caspasa activada 3-/CD8+/CAR+, o una combinación de las mismas.

[0117] En algunas divulgaciones, el fenotipo se evalúa mediante una respuesta a un estímulo, por ejemplo un estímulo que desencadena, induce, estimula o prolonga una función celular inmunitaria. En ciertas divulgaciones, las células se incuban en presencia de condiciones estimulantes o de un agente estimulante, el fenotipo es o incluye la respuesta a la estimulación. En divulgaciones particulares, el fenotipo es o incluye la producción o secreción de un factor soluble en respuesta a uno o más estímulos. En algunas divulgaciones, el fenotipo es o incluye una falta o producción o secreción de s factor soluble en respuesta a uno o más estímulos. En ciertas divulgaciones, el factor soluble es una citocina.

[0118] En algunas divulgaciones, las condiciones estimuladoras 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 estimulatorios, tales como citocinas, quimiocinas, antígenos, socios de unión, proteínas de fusión, receptores solubles recombinantes, y cualquier otro agente diseñado para activar las células. En algunas divulgaciones, las células se estimulan y el fenotipo se determina por la producción o secreción de un factor soluble, por ejemplo, una citocina o una quimiocina. En algunas divulgaciones, la estimulación es inespecífica, es decir, no es una estimulación antígeno-específica. En algunas divulgaciones, las células se incuban en presencia de condiciones estimulantes o de un agente estimulante durante aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 48 horas, o durante un periodo de tiempo comprendido entre 1 hora y 4 horas, entre 1 hora y 12 horas, entre 12 horas y 24 horas, cada uno inclusive, o durante más de 24 horas.

[0119] En algunas divulgaciones, las células se estimulan con un agente que es un antígeno o un epítipo del mismo que es específico del receptor recombinante, o es un anticuerpo o fragmento del mismo que se une y/o reconoce el receptor recombinante, o una combinación de los mismos. En algunas divulgaciones, el receptor recombinante es un CAR, y el agente es un antígeno o un epítipo del mismo que es específico del CAR, o es un anticuerpo o fragmento del mismo que se une y/o reconoce el CAR, o una combinación de los mismos. En determinadas divulgaciones, las células se estimulan incubándolas en presencia de células diana con expresión superficial del antígeno reconocido por el CAR. En ciertas divulgaciones, el receptor recombinante es un CAR, y el agente es un anticuerpo o un fragmento activo, variante o porción del mismo que se une al CAR. En ciertas divulgaciones, el anticuerpo o el fragmento activo, variante o porción del mismo que se une al CAR es un anticuerpo antiidiotípico (anti-ID).

[0120] En algunas divulgaciones, las condiciones o agentes estimulantes incluyen uno o más agente, por ejemplo, ligando, que es capaz de activar un dominio de señalización intracelular de un complejo TCR. En algunas divulgaciones, el agente activa o inicia la cascada de señalización intracelular TCR/CD3 en una célula T. Dichos agentes pueden incluir

anticuerpos, como los específicos para un componente del TCR y/o receptor coestimulador, por ejemplo, anti-CD3, anti-CD28, por ejemplo, unidos a un soporte sólido como una perla, y/o una o más citocinas. En algunas divulgaciones, uno o más agentes son PMA e ionomicina.

[0121] En divulgaciones particulares, el fenotipo es o incluye la producción o secreción de una citoquina en respuesta a uno o más de los estímulos. La producción y/o secreción de citoquinas contribuye a las respuestas inmunitarias y está implicada en diferentes procesos, como la inducción de proteínas antivirales y la inducción de la proliferación de células T. Las citocinas no son factores preformados, sino que se producen y secretan rápidamente en respuesta a la activación celular. La producción o secreción de citocinas puede medirse, detectarse y/o cuantificarse mediante cualquier técnica adecuada conocida en la técnica.

[0122] En ciertas divulgaciones, el fenotipo es la producción de una o más citoquinas. En divulgaciones particulares, la producción de una o más citocinas se mide, detecta y/o cuantifica mediante tinción intracelular de citocinas. La tinción intracelular de citocinas (ICS) mediante citometría de flujo es una técnica muy adecuada para estudiar la producción de citocinas a nivel unicelular. Detecta la producción y acumulación de citocinas en el retículo endoplásmico tras la estimulación celular, lo que permite identificar las poblaciones celulares positivas o negativas para la producción de una citocina determinada o separar las células de alta y baja producción en función de un umbral. El ICS también puede utilizarse en combinación con otros protocolos de citometría de flujo para el inmunofenotipado mediante marcadores de superficie celular o con multímeros MHC para acceder a la producción de citocinas en un subgrupo concreto de células, lo que lo convierte en un método extremadamente flexible y versátil. Otras técnicas unicelulares para medir o detectar la producción de citocinas incluyen, entre otras, ELISPOT, dilución limitante y clonación de células T.

[0123] En algunas divulgaciones, el fenotipo es la producción de una citoquina. En divulgaciones particulares, el fenotipo es la falta de producción de la citocina. En divulgaciones particulares, el fenotipo es positivo para o es un alto nivel de producción de una citoquina. En ciertas divulgaciones, el fenotipo es negativo para o es un nivel bajo de producción de una citocina. Las citocinas pueden incluir, entre otras, IL-1, IL-1 β , IL-2, sIL-2Ra, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-27, IL-33, IL-35, TNF, TNF alfa, CXCL2, CCL2, CCL3, CCL5, CCL17, CCL24, PGD2, LTB4, interferón gamma (IFN- γ), factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-1a, MIP-1b, Flt-3L, fractalquina y/o IL-5.

[0124] En algunas divulgaciones, el fenotipo es o incluye la producción de una citoquina. En ciertas divulgaciones, el fenotipo es o incluye la producción de más de una citocina. En ciertas divulgaciones, el fenotipo es o incluye la falta de producción de una o más citocinas. En ciertas divulgaciones, el fenotipo es o incluye la producción, o falta de producción, de uno o más de IL-2, IL-13, IFN-gamma o TNF-alfa. En algunas divulgaciones, el fenotipo es la presencia de una producción, y/o la presencia de un alto nivel de producción de la citoquina. En algunas divulgaciones, el fenotipo es una producción baja, reducida o ausente de una citocina.

[0125] En algunas divulgaciones, el fenotipo es o incluye la producción interna (intracelular) de una citoquina, por ejemplo, evaluada en presencia de un agente estimulador o en condiciones estimuladoras cuando se impide o inhibe la secreción. En divulgaciones particulares, el fenotipo es o incluye la falta o ausencia de una producción interna de una citoquina. En ciertas divulgaciones, el fenotipo es o incluye la cantidad interna de una o más citocinas cuando la producción de más de una citocina se evalúa con un ensayo ICS. En ciertas divulgaciones, el fenotipo es o incluye la cantidad interna de uno o más de IL-2, IL-13, IFN-gamma o TNF-alfa según se evalúa con un ensayo ICS. En algunas divulgaciones, el fenotipo es o incluye una cantidad interna baja o una falta de una cantidad detectable de una o más citocinas según se evalúa con un ensayo ICS. En ciertas divulgaciones, el fenotipo es o incluye una cantidad interna baja o la falta de una cantidad detectable de IL-2, IL-13, IFN-gamma o TNF-alfa según se evalúa con un ensayo de ICS.

[0126] Las divulgaciones particulares contemplan que el fenotipo puede incluir la producción de una citocina o la falta o baja cantidad de producción de una citocina. Esto puede depender de varios factores que incluyen, pero no se limitan a, la identidad de la citoquina, el ensayo realizado para detectar la citoquina, y el agente estimulante o condición utilizada con el ensayo. Por ejemplo, en algunas divulgaciones se contempla que el fenotipo es o incluye una falta de, o un bajo nivel de producción de IL-13 según lo indicado por ICS mientras que en algunas divulgaciones, el fenotipo es o incluye la producción de IFN-gamma según lo indicado por ICS.

[0127] En algunas divulgaciones, el fenotipo es o incluye la producción de una o más citocinas y CD3+, CD4+, CD8+, CD3+/CAR+, CD4+/CAR+, CD8+/CAR+, anexina V-, anexina V- CD3+, anexina V-CD4+, anexina V- CD8+, anexina V-CD3+/CAR+, anexina V- CD4+/CAR+, anexina V- CD8+/CAR+, caspasa activada 3-, caspasa activada 3-/CD3+, caspasa activada 3-/CD4+, caspasa activada 3-/CD8+, caspasa activada 3-/CD3+/CAR+, caspasa activada 3-/CD4+/CAR+, o caspasa activada 3-/CD8+/CAR+, o una combinación de las mismas. En divulgaciones particulares, el fenotipo es o incluye la producción de una o más citocinas en CD4+/CAR+ y/o CD8+/CAR+.

[0128] En algunas divulgaciones, el fenotipo es o incluye una falta de producción de una o más citoquinas. En ciertas divulgaciones, el fenotipo es o incluye la falta de producción de una o más citocinas y de CD3+, CD4+, CD8+, CD3+/CAR+, CD4+/CAR+, CD8+/CAR+, anexina V-, anexina V- CD3+, anexina V-CD4+, anexina V- CD8+, anexina V-CD3+/CAR+, anexina V- CD4+/CAR+, anexina V- CD8+/CAR+, caspasa activada 3-, caspasa activada 3-/CD3+, caspasa activada 3-/CD4+, caspasa activada 3-/CD8+, caspasa activada 3-/CD3+/CAR+, caspasa activada 3-/CD4+/CAR+, o caspasa

activada 3-/CD8+/CAR+, o una combinación de las mismas.

[0129] En divulgaciones particulares, el fenotipo es o incluye la presencia o ausencia de una cantidad interna de uno o más de IL-2, IL-13, IFN-gamma, o TNF-alfa como se evalúa con un ensayo ICS y uno o más marcadores específicos para un subconjunto de células o células de un tipo celular particular. En algunas divulgaciones, el fenotipo es o incluye la producción, o ausencia de la misma, de uno o más de IL-2, IL-13, IFN-gamma o TNF-alfa y CD4+/CAR+ y/o CD8+/CAR+. En ciertas divulgaciones, el fenotipo es o incluye la producción de IL-2 y CD4+/CAR+ y/o CD8+/CAR+. En algunas divulgaciones, el fenotipo es o incluye una falta o baja producción de IL-2 y CD4+/CAR+ y/o CD8+/CAR+. En algunas divulgaciones, el fenotipo es o incluye la producción de IL-13 y CD4+/CAR+ y/o CD8+/CAR+. En algunas divulgaciones, el fenotipo es o incluye la producción de IL-13 y CD4+/CAR+ y/o CD8+/CAR+. En ciertas divulgaciones, el fenotipo es o incluye la falta o baja producción de IL-13 y CD4+/CAR+ y/o CD8+/CAR+. En algunas divulgaciones, el fenotipo es o incluye la producción de IFN-gamma y CD4+/CAR+ y/o CD8+/CAR+. En ciertas divulgaciones, el fenotipo es o incluye la producción de TNF-alfa y CD4+/CAR+ y/o CD8+/CAR+. En ciertas divulgaciones, el fenotipo es o incluye una falta o baja producción de TNF-alfa y CD4+/CAR+ y/o CD8+/CAR+.

[0130] Cualquiera o más de los fenotipos, solos o en combinación, pueden evaluarse o determinarse de acuerdo con los métodos divulgados. En algunas divulgaciones, el fenotipo es CD3+, CD3+/CAR+, CD4+/CAR+, CD8+/CAR+, o una combinación de los mismos.

[0131] En ciertas divulgaciones, el fenotipo es o incluye CD3+. En ciertas divulgaciones, el fenotipo es o incluye CD3+/CAR+. En algunas divulgaciones, el fenotipo es o incluye CD8+/CAR+. En ciertas divulgaciones, el fenotipo es o incluye

[0132] En divulgaciones particulares, el fenotipo es o incluye Anexina-/CD3+/CAR+. En algunas divulgaciones, el fenotipo es o incluye Anexina-/CD4+/CAR+. En divulgaciones particulares, el fenotipo es Anexina-/CD8+/CAR+.

[0133] En divulgaciones particulares, el fenotipo es o incluye una falta de o una baja cantidad de IL-2 intracelular y CD4+/CAR+. En divulgaciones particulares, el fenotipo es una falta o una cantidad baja de IL-13 intracelular y CD4+/CAR+. En algunas divulgaciones, el fenotipo es una falta o una baja cantidad de expresión intracelular de IL-13 y células CD8+/CAR+. En divulgaciones particulares, el fenotipo es una falta o una cantidad baja de TNF-alfa CD4+/CAR+ intracelular.

[0134] En ciertas divulgaciones, el fenotipo es o incluye CD8+/CAR+. En ciertas divulgaciones, el fenotipo es o incluye anexina-/CD8+/CAR+.

[0135] En ciertas divulgaciones, se determina, mide, obtiene, detecta, observa y/o identifica un número, múltiplo o fracción de células de un fenotipo particular de una composición celular. En algunas divulgaciones, la composición celular es una composición de células T. En ciertas divulgaciones, la composición celular contiene células que expresan un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR. En divulgaciones particulares, la composición celular es una composición T terapéutica que contiene células que expresan un receptor recombinante que puede administrarse a un sujeto para tratar una enfermedad o afección. En ciertas divulgaciones, el número de células del fenotipo es la cantidad total de células del fenotipo de la composición celular. En ciertas divulgaciones, el número de células del fenotipo es el número total de células del fenotipo presentes en una dosis de la composición celular. En divulgaciones particulares, el número de células del fenotipo es el número de células del fenotipo presentes en una muestra de la composición celular. En algunas divulgaciones, el número de células del fenotipo puede expresarse como una frecuencia, una relación y/o un porcentaje de células del fenotipo presentes en la composición celular, o una dosis o una muestra de la misma.

[0136] En algunas divulgaciones, la composición celular se obtiene de un sujeto, y el número, múltiplo o fracción de células del fenotipo es el número de células del fenotipo presentes en la composición celular normalizado al peso corporal del sujeto. En ciertas divulgaciones, la medida del fenotipo es el número de células del fenotipo por libra de peso corporal del sujeto. En divulgaciones particulares, la medida del fenotipo es el número de células del fenotipo por 1 libra, 2 libras, 3 libras, 4 libras, 5 libras, 10 libras, de 20 libras de peso corporal del sujeto. En algunas divulgaciones, la medida del fenotipo es el número de células del fenotipo por kg de peso corporal del sujeto. En divulgaciones particulares, la medida del fenotipo es el número de células del fenotipo por 1 kg, 2 kg, 3 kg, 4 kg, 5 kg, 10 kg, o 20 kg o el peso corporal del sujeto.

[0137] En divulgaciones particulares, el número, múltiplo o fracción de las células de un fenotipo se transforma, por ejemplo para comprimir el intervalo de valores relevantes del número, múltiplo o fracción. En algunas divulgaciones, la transformación es cualquier aplicación de una función matemática determinista a cada punto de un conjunto de datos, como por ejemplo, cada punto de datos x se sustituye por el valor transformado $y = f(x)$, donde f es una función. En general, las transformaciones pueden aplicarse para que los datos parezcan cumplir mejor los supuestos de un procedimiento de inferencia estadística que se vaya a aplicar, o para mejorar la interpretabilidad o el aspecto de los gráficos. En la mayoría de los casos, la función que se utiliza para transformar los datos es invertible y, por lo general, continua. La transformación suele aplicarse a una colección de mediciones comparables. Ejemplos de transformaciones adecuadas incluyen, pero no se limitan a, transformaciones de logaritmo y raíz cuadrada, transformaciones recíprocas y transformaciones de potencia. En ciertas divulgaciones, el número, múltiplo o fracción de las células de un fenotipo se transforma mediante una transformación logarítmica. En ciertas divulgaciones, la transformación logarítmica es un

logaritmo común ($\log_{10}(x)$), un logaritmo natural ($\ln(x)$) o un logaritmo binario ($\log_2(x)$).

B. Actividad específica del antígeno o dependiente del receptor recombinante

- 5 **[0138]** Las divulgaciones particulares contemplan que una actividad dependiente del receptor recombinante, por ejemplo, una actividad dependiente de CAR, o "B", es una actividad que ocurre en una célula que expresa un receptor recombinante que no ocurre y/o no puede ocurrir en una célula que no expresa el receptor recombinante. En algunas divulgaciones, la actividad dependiente del receptor recombinante es una actividad que depende de una actividad o presencia del receptor recombinante. La actividad dependiente del receptor recombinante puede ser cualquier proceso celular que esté directa o indirectamente influido por la expresión y/o presencia del receptor recombinante o por un cambio en la actividad, como la estimulación del receptor, del receptor recombinante. En algunas divulgaciones, la actividad dependiente del receptor recombinante puede incluir, entre otros, procesos celulares como la división celular, la replicación del ADN, la transcripción, la síntesis de proteínas, el transporte de membrana, la translocación de proteínas y/o la secreción, o puede ser una función celular inmunitaria, por ejemplo, una actividad citolítica. En ciertas divulgaciones, la actividad dependiente del receptor recombinante puede medirse por un cambio en la confirmación del receptor CAR, la fosforilación de una molécula de señalización intracelular, la degradación de una proteína, la transcripción, traducción, translocación de una proteína, y/o la producción y secreción de un factor, tal como una proteína, o factor de crecimiento, citoquina. En ciertas divulgaciones, el receptor recombinante es un CAR.
- 10
- 15
- 20 **[0139]** En ciertas divulgaciones, la actividad dependiente del receptor recombinante, por ejemplo, una actividad dependiente de CAR es una medida de un factor, por ejemplo, una cantidad o concentración, o un cambio en la cantidad o concentración tras la estimulación de la composición celular. En ciertas divulgaciones, el factor puede ser una proteína, una proteína fosforilada, una proteína escindida, una proteína translocada, una proteína en una confirmación activa, un polinucleótido, un polinucleótido de ARN, un ARNm y/o un ARNhc. En ciertas divulgaciones, la medición puede incluir, pero no se limita a, un aumento o disminución de la actividad quinasa, la actividad proteasa, la actividad fosfatasa, la producción de AMPc, el metabolismo del ATP, la translocación, por ejemplo, una localización nuclear de una proteína, un aumento de la actividad transcripcional, un aumento de la actividad traslacional, la producción y/o secreción de un factor soluble, la captación celular, la ubiquitinación, y/o la degradación de proteínas.
- 25
- 30 **[0140]** En divulgaciones particulares, el factor es un factor soluble que es secretado, tal como una hormona, un factor de crecimiento, una quimioquina, y/o una citoquina.
- [0141]** En algunas divulgaciones, la actividad del receptor recombinante, por ejemplo, una actividad dependiente de CAR es una respuesta a la estimulación. En ciertas divulgaciones, las células se incuban en presencia de condiciones estimulantes o de un agente estimulante, y la actividad es o incluye al menos un aspecto de una respuesta a la estimulación. Una respuesta puede incluir, entre otros, un evento de señalización intracelular, como un aumento de la actividad de una molécula receptora, un aumento de la actividad quinasa de una o más quinasas, un aumento de la transcripción de uno o más genes, un aumento de la síntesis proteica de una o más proteínas y/o una molécula de señalización intracelular, por ejemplo, un aumento de la actividad quinasa de una proteína. En algunas divulgaciones, la respuesta o actividad está asociada con una actividad inmunitaria, y puede incluir, pero no se limita a, la producción y/o secreción de un factor soluble, por ejemplo, una citoquina, un aumento en la producción de anticuerpos, y/o un aumento en la actividad citolítica.
- 35
- 40
- 45 **[0142]** En divulgaciones particulares, la respuesta a una estimulación de una composición celular se evalúa midiendo, detectando o cuantificando una respuesta a un estímulo, es decir, al menos una actividad que es iniciada, desencadenada, apoyada, prolongada y/o causada por el estímulo. En ciertas divulgaciones, las células se estimulan y la respuesta a la estimulación es una actividad específica de las células que expresan un receptor recombinante. En ciertas divulgaciones, la actividad es una actividad específica del receptor recombinante y la actividad se produce en células que expresan el receptor recombinante, pero no se produce, o sólo se produce mínimamente, en células que no expresan el receptor. En determinadas divulgaciones, el receptor recombinante es un CAR. En algunas divulgaciones, la actividad es una actividad dependiente de CAR.
- 50
- [0143]** Las condiciones utilizadas para estimular las células, por ejemplo, células inmunitarias o células T, pueden incluir uno o más de los medios particulares, temperatura, contenido de oxígeno, contenido de dióxido de carbono, tiempo, agentes, por ejemplo, nutrientes, aminoácidos, antibióticos, iones, y/o factores estimulantes, tales como citocinas, quimocinas, antígenos, socios de unión, proteínas de fusión, receptores solubles recombinantes, y cualquier otro agente diseñado para activar las células. En algunas divulgaciones, las células se estimulan y la actividad se determina por la producción o secreción de un factor soluble, por ejemplo, una citocina o una quimioquina. En algunas divulgaciones, la estimulación es inespecífica, es decir, no es una estimulación antígeno-específica.
- 55
- 60
- [0144]** En algunas divulgaciones, la actividad es específica de las células que expresan un receptor recombinante. En algunas divulgaciones, una actividad que es específica de células que expresan un receptor recombinante no se produce en células que carecen de expresión del receptor recombinante. En ciertas divulgaciones, el receptor recombinante es un CAR, y la actividad es una actividad dependiente de CAR. En divulgaciones particulares, la actividad no está presente en células que carecen de expresión del receptor recombinante en las mismas condiciones en las que la actividad está presente en células que expresan el receptor recombinante. En determinadas divulgaciones, la actividad dependiente de
- 65

CAR es aproximadamente un 10%, un 20%, un 30%, un 40%, un 50%, un 60%, un 70%, un 75%, un 80%, un 85%, un 90%, un 95%, un 97%, un 98%, un 99% o un 99% menor que la actividad dependiente de CAR en células CAR en las mismas condiciones.

5 **[0145]** En algunas divulgaciones, la actividad es específica de las células que expresan un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR, y la actividad se produce por estimulación con un agente o en condiciones estimuladoras que son específicas de las células que expresan el receptor recombinante. En algunas divulgaciones, el receptor recombinante es un CAR, y una estimulación específica de CAR estimula, desencadena, inicia y/o prolonga una actividad en células CAR+, pero no estimula, desencadena, inicia y/o prolonga la actividad en células CAR-. En algunas divulgaciones, la actividad dependiente de CAR es aproximadamente un 10%, un 20%, un 30%, un 40%, un 50%, un 60%, un 70%, un 75%, un 80%, un 85%, un 90%, un 95%, un 97%, un 98%, un 99% o un 99% menor en las células CAR- que en las células CAR+ tras la estimulación por el estímulo específico de CAR.

15 **[0146]** En ciertas divulgaciones, la actividad es dependiente del receptor recombinante, por ejemplo, una actividad dependiente de CAR que es estimulada por un agente que es específico para el receptor recombinante. En algunas divulgaciones, el agente específico de receptor recombinante, por ejemplo, un agente específico de CAR, es un antígeno o un epítipo del mismo que se une y/o es reconocido por el receptor recombinante, por ejemplo, el CAR. En algunas divulgaciones, el agente específico del receptor recombinante es un anticuerpo o fragmento activo del mismo que se une y/o reconoce el receptor recombinante. En algunas divulgaciones, el agente es un anticuerpo antiidiotípico o un fragmento activo, variante o porción del mismo (anti-ID) que se une al receptor recombinante. En ciertas divulgaciones, el agente receptor específico recombinante es una célula que expresa el antígeno en su superficie. En algunas divulgaciones, la actividad dependiente del receptor recombinante es estimulada por un antígeno o un epítipo del mismo que está unido y/o es reconocido por el receptor recombinante. En ciertas divulgaciones, la actividad dependiente del receptor recombinante es estimulada por un anticuerpo o fragmento activo del mismo que se une a y/o reconoce el receptor recombinante. En divulgaciones particulares, la actividad dependiente del receptor recombinante es estimulada por un anti-ID.

30 **[0147]** En algunas divulgaciones, la actividad se mide en la composición celular que contiene células que expresan un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR, y la medición se compara con uno o más controles. En ciertas divulgaciones, el control es una composición similar o idéntica de células que no fue estimulada. Por ejemplo, en algunas divulgaciones, la actividad se mide en una composición celular después o durante la incubación con un agente, y la medición resultante se compara con una medición de control de la actividad de la composición celular similar o idéntica que no se incubó con el agente. En algunas divulgaciones, la actividad es una actividad dependiente del receptor recombinante, y tanto la composición celular como la composición celular de control contienen células que expresan el receptor recombinante. En algunas divulgaciones, la actividad es una actividad dependiente del receptor recombinante, y el control se toma de una composición celular similar que no contiene células que expresen el receptor recombinante, por ejemplo, células CAR+. Así, en algunas divulgaciones, una composición celular que contiene células que expresan receptores recombinantes y una composición celular de control que no contiene células que expresan receptores recombinantes se ponen en contacto con un agente específico que expresa receptores recombinantes. En ciertas divulgaciones, el control es una medición de la misma composición celular que expresa un receptor recombinante que se toma antes de cualquier estimulación. En ciertas divulgaciones, se obtiene una medición de control para determinar una señal de fondo, y la medición de control se resta de la medición de la actividad. En algunas divulgaciones, la medición de la actividad en la composición celular se divide por la medición de control, para obtener un valor que es una relación de la actividad sobre un nivel de control.

45 **[0148]** En divulgaciones particulares, la actividad es o incluye la producción y/o secreción de un factor soluble. En algunas divulgaciones, la actividad es un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR, actividad dependiente que es o incluye la producción y/o secreción de un factor soluble. En ciertas divulgaciones, el factor soluble es una citocina o una quimiocina.

50 **[0149]** Las técnicas adecuadas para la medición de la producción o secreción de un factor soluble son conocidas en la técnica. La producción y/o secreción de un factor soluble puede medirse determinando la concentración o cantidad extracelular del factor, o determinando la cantidad de actividad transcripcional del gen que codifica el factor. Las técnicas adecuadas incluyen, entre otras, ensayos tales como inmunoensayos, ensayos basados en aptámeros, ensayos histológicos o citológicos, ensayos de niveles de expresión de ARNm, ensayos de inmunoabsorción enzimática (ELISA), inmunotransferencia, inmunoprecipitación, radioinmunoensayo (RIA), inmunotinción, ensayo de citometría de flujo, resonancia de plasmón superficial (SPR), ensayo de quimioluminiscencia, inmunoensayo de flujo lateral, ensayo de inhibición o ensayo de avididad, micromatrices de proteínas, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), electroquimioluminiscencia Meso Scale Discovery (MSD) e inmunoensayos multiplex basados en microesferas (MIA). En algunas divulgaciones, la técnica adecuada puede emplear un reactivo de unión detectable que se une específicamente al factor soluble.

60 **[0150]** En determinadas divulgaciones, la medición del factor soluble se realiza mediante ELISA (ensayo inmunoenzimático). ELISA es una técnica de ensayo en placa diseñada para detectar y cuantificar sustancias como péptidos, citocinas, anticuerpos y hormonas. En un ELISA, el factor soluble debe inmovilizarse en una superficie sólida y, a continuación, formar un complejo con un anticuerpo unido a una enzima. La detección se realiza evaluando la actividad de la enzima conjugada mediante la incubación con un sustrato para producir una señal detectable. En algunas divulgaciones, la actividad dependiente de CAR se mide con un ensayo ELISA.

[0151] En algunas divulgaciones, la actividad dependiente del receptor recombinante es una secreción o producción del factor soluble. En ciertas divulgaciones, la producción o secreción se estimula en una composición celular que contiene células que expresan receptores recombinantes, por ejemplo, células que expresan CAR, mediante un agente específico de receptor recombinante, por ejemplo, un agente específico de CAR+. En algunas divulgaciones, el agente específico del receptor recombinante que es un antígeno o un epítipo del mismo que es específico del receptor recombinante; una célula, por ejemplo, una célula diana, que expresa el antígeno; o un anticuerpo o una porción o variante del mismo que se une y/o reconoce el receptor recombinante; o una combinación de los mismos. En ciertas divulgaciones, el agente específico del receptor recombinante es una proteína recombinante que comprende el antígeno o epítipo del mismo que se une o es reconocido por el receptor recombinante.

[0152] En ciertas divulgaciones, la producción y/o secreción del factor soluble dependiente del receptor recombinante se mide incubando la composición celular que contiene células que expresan el receptor recombinante, por ejemplo, un CAR, con un agente específico del receptor recombinante, por ejemplo, un agente específico CAR+. En ciertas divulgaciones, el factor soluble es una citocina o una quimioquina. En algunas divulgaciones, las células de la composición celular que contienen células que expresan receptores recombinantes se incuban en presencia del agente específico del receptor recombinante durante una cantidad de tiempo, y la producción y/o secreción del factor soluble se mide en uno o más puntos temporales durante la incubación. En algunas divulgaciones, las células se incuban con el agente específico de CAR durante hasta o aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, unas 20 horas, unas 21 horas, unas 22 horas, unas 23 horas, unas 24 horas, unas 48 horas, o durante un período de tiempo comprendido entre 1 hora y 4 horas, entre 1 hora y 12 horas, entre 12 horas y 24 horas, cada una de ellas inclusive, o durante más de 24 horas y la cantidad de un factor soluble, p. ej.g., una citoquina.

[0153] En algunas divulgaciones, el agente específico del receptor recombinante es una célula diana que expresa un antígeno reconocido por el receptor recombinante. En algunas divulgaciones, el receptor recombinante es un CAR, y las células de la composición celular se incuban con las células diana en una proporción de células totales, células CAR+, células CAR+/CD8+, o células Anexina-/CAR+/CD8+ de la composición celular con respecto a las células diana de aproximadamente 10:1, aproximadamente 5:1, aproximadamente 4:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 1:1, aproximadamente 1:2, aproximadamente 1:3, aproximadamente 1:4, aproximadamente 1:5, aproximadamente 1:6, aproximadamente 1:7, aproximadamente 1:8, aproximadamente 1:9, o aproximadamente 1:10, o un intervalo entre cualquiera de los anteriores, como en una proporción entre 10:1 y 1:1, 3:1 y 1:3, o 1:1 y 1:10, cada uno inclusive.

[0154] En algunas divulgaciones, entre aproximadamente 1×10^2 y aproximadamente 1×10^4 , entre aproximadamente 1×10^3 y aproximadamente 1×10^5 , entre aproximadamente 1×10^4 y aproximadamente 1×10^6 , entre aproximadamente 1×10^5 y aproximadamente 1×10^7 , entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 1×10^8 , entre aproximadamente 1×10^7 y aproximadamente 1×10^9 , o entre aproximadamente 1×10^8 y aproximadamente 1×10^{10} células de la composición celular, cada una inclusive, se incuban con el agente específico de receptor recombinante, por ejemplo, un reactivo específico CAR+. En algunas divulgaciones, entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 1×10^7 células de la composición celular, inclusive, se incuban con el agente específico de receptor recombinante, por ejemplo, un reactivo específico CAR+. En ciertas divulgaciones, se incuban aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células de la composición con el agente específico del receptor recombinante. En determinadas divulgaciones, entre aproximadamente 1×10^2 y aproximadamente 1×10^4 , entre aproximadamente 1×10^3 y aproximadamente 1×10^5 , entre aproximadamente 1×10^4 y aproximadamente 1×10^6 , entre aproximadamente 1×10^5 y aproximadamente 1×10^7 , entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 1×10^8 , entre aproximadamente 1×10^7 y aproximadamente 1×10^9 , o entre aproximadamente 1×10^8 y aproximadamente 1×10^{10} células que expresan receptores recombinantes, células CAR+, células CAR+/CD8+, o células Anexina-/CAR+/CD8+ de la composición celular, cada una inclusive, se incuban con el agente específico CAR+.

[0155] En algunas divulgaciones, las células de la composición celular se incuban con el agente específico de receptor recombinante, por ejemplo, un agente específico CAR+, en un volumen de medio celular. En ciertas divulgaciones, las células se incuban con el agente específico del receptor recombinante en un volumen de al menos o aproximadamente 1 μ l, al menos o aproximadamente 10 μ l, al menos o aproximadamente 25 μ l, al menos o aproximadamente 50 μ l, al menos o aproximadamente 100 μ l, al menos o aproximadamente 500 μ l, al menos o aproximadamente 1 mL, al menos o aproximadamente 1.5 mL, al menos o aproximadamente 2 mL, al menos o aproximadamente 2,5 mL, al menos o aproximadamente 5 mL, al menos o aproximadamente 10 mL, al menos o aproximadamente 20 mL, al menos o aproximadamente 25 mL, al menos o aproximadamente 50 mL, al menos o aproximadamente 100 mL, o superior a 100 mL. En ciertas divulgaciones, las células se incuban con el agente específico CAR+ en un volumen comprendido entre aproximadamente 1 μ l y aproximadamente 100 μ l, entre aproximadamente 100 μ l y aproximadamente 500 μ l, entre aproximadamente 500 μ l y aproximadamente 1 mL, entre aproximadamente 500 μ l y aproximadamente 1 mL, entre aproximadamente 1 mL y aproximadamente 10 mL, entre aproximadamente 10 mL y aproximadamente 50 mL, o entre aproximadamente 10 mL y aproximadamente 100 mL, cada uno inclusive. En ciertas divulgaciones, las células se incuban con el agente específico del receptor recombinante en un volumen de entre aproximadamente 100 μ l y aproximadamente 1 mL, ambos inclusive. En divulgaciones particulares, las células se incuban con el agente específico del receptor

recombinante en un volumen de aproximadamente 500 µl.

[0156] En algunas divulgaciones, las células de la composición celular se incuban con el agente específico CAR+ en una cantidad de entre aproximadamente 1 fmol y aproximadamente 1 pmol, entre aproximadamente 1 pmol y aproximadamente 1 nmol, entre aproximadamente 1 nmol y aproximadamente 1 µmol, entre aproximadamente 1 µmol y aproximadamente 1 mmol, o entre aproximadamente 1 mmol y 1 mol, cada uno inclusive. En divulgaciones particulares, las células de la composición celular se incuban con el agente específico CAR+ a una concentración de entre aproximadamente 1 fM y aproximadamente 1 pM, entre aproximadamente 1 pM y aproximadamente 1 nM, entre aproximadamente 1 nM y aproximadamente 1 µM, entre aproximadamente 1 µM y aproximadamente 1 mM, o entre aproximadamente 1 mM y 1 mol, cada uno inclusive. Las unidades ejemplares incluyen, entre otras, pg/ mL, pg/(mL/hr), pg/(mL × célula), pg/(mL × hr × célula) y pg/(mL × hr × 10⁶ células).

[0157] En ciertas divulgaciones, la medición de la actividad específica del receptor recombinante, por ejemplo, la actividad específica CAR+ es la cantidad o concentración, o una cantidad o concentración relativa, del factor soluble en la composición de células T en un punto temporal durante o al final de la incubación. En determinadas divulgaciones, la medición se resta o se normaliza con respecto a una medición de control. En algunas divulgaciones, la medición de control es una medición de la misma composición celular tomada antes de la incubación. En divulgaciones particulares, la medición de control es una medición tomada de una composición celular de control idéntica que no se incubó con el agente de estimulación específico del receptor recombinante. En ciertas divulgaciones, el control es una medición tomada en un punto temporal idéntico durante la incubación con el agente específico de receptor recombinante de una composición celular que no contiene células positivas de receptor recombinante.

[0158] En algunas divulgaciones, la medición es una relación normalizada de la cantidad o concentración en comparación con el control. En determinadas divulgaciones, la medida es la cantidad o concentración del factor soluble por una cantidad de tiempo, por ejemplo, por minuto o por hora. En algunas divulgaciones, la medida es una cantidad o concentración del factor soluble por célula o por un conjunto o número de referencia de células, por ejemplo, por 100 células, por 10³ células, por 10⁴ células, por 10⁵ células, por 10⁶ células, etc. En algunos casos, la medida es la cantidad o concentración del factor soluble por una cantidad de tiempo, por célula o por número de referencia de células. En algunas divulgaciones, la medida es la cantidad o concentración del factor soluble por célula que expresa el receptor recombinante, célula CAR+, célula CAR+/CD8+ o célula Anexina-/CAR+/CD8+ de la composición celular. En ciertas divulgaciones, la medida es la cantidad o concentración del factor soluble por cantidad de tiempo (por ejemplo, por minuto o por hora) por célula que expresa el receptor recombinante, célula CAR+, célula CAR+/CD8+, o célula Anexina-/CAR+/CD8+ de la composición celular. En algunas divulgaciones, la medida es la cantidad o concentración del factor soluble por una cantidad de tiempo por cantidad o concentración del receptor recombinante o agente específico CAR+. En algunas divulgaciones, la medida es una cantidad o concentración del factor soluble por célula o por un conjunto o número de referencia de células por cantidad o concentración del agente específico CAR+. En algunos casos, la medida es la cantidad o concentración del factor soluble por una cantidad de tiempo, por cantidad o concentración del receptor recombinante o agente específico CAR+, por célula o por número de referencia de células. En algunas divulgaciones, la medida es la cantidad o concentración del factor soluble por cantidad o concentración del receptor recombinante o agente específico CAR+, por célula que expresa el receptor recombinante, célula CAR+, células CAR+/CD8+, o célula Anexina-/CAR+/CD8+ de la composición celular. En ciertas divulgaciones, la medida es la cantidad o concentración del factor soluble por cantidad de tiempo, por cantidad o concentración del receptor recombinante o agente específico CAR+, por cantidad de células CAR+, células CAR+/CD8+, o células Anexina-/CAR+/CD8+ de la composición celular.

[0159] En divulgaciones particulares, la actividad dependiente del receptor recombinante o CAR es la producción o secreción de dos o más factores solubles. En ciertas divulgaciones, el receptor recombinante o la actividad dependiente de CAR es la producción o secreción de dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más de diez factores solubles. En algunas divulgaciones, las mediciones de los dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más de diez factores solubles se combinan en una media aritmética o una media geométrica. En ciertas mediciones, la medida de la actividad del receptor recombinante es la secreción de son compuestos de dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, o más de diez factores solubles.

[0160] En divulgaciones particulares, la medición de la actividad dependiente del receptor recombinante se transforma, por ejemplo, mediante una transformación logarítmica. En ciertas divulgaciones, la medición de la actividad del receptor recombinante se transforma mediante un logaritmo común ($\log_{10}(x)$), un logaritmo natural ($\ln(x)$) o un logaritmo binario ($\log_2(x)$). En algunas divulgaciones, la medición de la actividad dependiente del receptor recombinante es un compuesto de la medición de la producción o secreción de dos factores solubles más. En algunas divulgaciones, dos o más mediciones de la producción o secreción de factores solubles se transforman antes de combinarse en una medición compuesta. En divulgaciones particulares, la medición de la actividad dependiente del receptor recombinante se transforma antes de la normalización a una medición de referencia. En ciertas divulgaciones, la medición de la actividad dependiente del receptor recombinante se transforma antes de la normalización a una medición de referencia.

[0161] En ciertas divulgaciones, el factor soluble es una citoquina. Las citoquinas son un amplio grupo de pequeñas moléculas de señalización que intervienen ampliamente en la comunicación celular. Las citocinas suelen asociarse a diversas moléculas moduladoras del sistema inmunitario, como las interleucinas, las quimiocinas y los interferones. Alternativamente, las citocinas pueden caracterizarse por su estructura, que se clasifica en cuatro familias: la familia de

las cuatro hélices alfa, que incluye la subfamilia de la IL-2, la subfamilia del IFN y la subfamilia de la IL-10; la familia de la IL-1, la familia de la IL-17 y las citocinas de nudo de cisteína, que incluyen miembros de la familia del factor de crecimiento transformante beta. En algunas divulgaciones, la actividad dependiente de CAR es la producción o secreción de uno o más factores solubles que incluyen interleucinas, interferones y quimiocinas. En divulgaciones particulares, la actividad dependiente de CAR es la producción o secreción de uno o más de un miembro de la familia IL-2, un miembro de la subfamilia IFN, un miembro de la subfamilia IL-10; un miembro de la familia IL-1, un miembro de la familia IL-17, una citoquina de cisteína, y/o un miembro de la familia del factor de crecimiento transformante beta.

[0162] En divulgaciones particulares, la actividad dependiente del receptor recombinante o CAR es la producción y/o secreción de una o más de las siguientes IL-1, IL-1 β , IL-2, sIL-2Ra, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-27, IL-33, IL-35, TNF, TNF alfa, CXCL2, CCL2, CCL3, CCL5, CCL17, CCL24, PGD2, LTB4, interferón gamma (IFN- γ), factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-1a, MIP-1b, Flt-3L, fractalquina, y/o IL-5. En ciertas divulgaciones, la actividad dependiente de CAR producción o secreción de una citoquina Th17. En algunas divulgaciones, la citoquina Th17 es GMCSF. En algunas divulgaciones, la actividad dependiente de CAR comprende la producción o secreción de una citocina Th2, en la que la citocina Th2 es IL-4, IL-5, IL-10 o IL-13.

[0163] En ciertas divulgaciones, la actividad dependiente del receptor recombinante o CAR es la producción o secreción de una citoquina proinflamatoria. Las citocinas proinflamatorias desempeñan un papel en el inicio de la respuesta inflamatoria y en la regulación de la defensa del huésped frente a patógenos mediando la respuesta inmunitaria innata. Las citocinas proinflamatorias incluyen, entre otras, las interleucinas (IL), la interleucina-1-beta (IL-1), la interleucina-3 (IL-3), la interleucina-5 (IL-5), la interleucina-6 (IL-6), la interleucina-13 (IL-13), el factor de necrosis tumoral (TNF), el ligando 2 de la quimiocina CXC (CXCL2), el ligando 2 de la quimiocina CC (CCL2), el ligando 3 de la quimiocina CC (CCL3), el ligando 5 de la quimiocina CC (CCL5), el ligando 17 de la quimiocina CC (CCL17), el ligando 24 de la quimiocina CC (CCL24), la prostaglandina D2 (PGD2) y el leucotrieno B4 (LTB4), así como la IL-33. (Para más información sobre la IL-33, consúltese el documento de referencia.). En algunas divulgaciones, la actividad dependiente de CAR es la producción y/o secreción de una interleucina y/o un miembro de la familia TNF. En determinadas divulgaciones, la actividad dependiente de CAR es la producción y/o secreción de IL-1, IL-6, IL-8 e IL-18, TNF-alfa o una combinación de las mismas.

[0164] En determinadas divulgaciones, la actividad específica de CAR es la secreción de IL-2, IFN-gamma, TNF-alfa o una combinación de los mismos.

[0165] En divulgaciones particulares, la actividad es citolítica (citotóxica) de la composición de células T. En divulgaciones particulares, la actividad es un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR, actividad citolítica dependiente. En algunas divulgaciones, la actividad citolítica dependiente del receptor recombinante se evalúa exponiendo, incubando y/o poniendo en contacto células que expresan el receptor recombinante, o una composición celular que contiene células que expresan el receptor recombinante, con una célula diana que expresa el antígeno y/o un epítipo que está unido y/o es reconocido por el receptor recombinante. La actividad citolítica puede medirse midiendo directa o indirectamente el número de células diana a lo largo del tiempo. Por ejemplo, las células diana pueden incubarse con un marcador detectable antes de incubarlo con las células que expresan el receptor recombinante, como un marcador detectable después de lisar la célula diana, o un marcador detectable en células diana viables. Estas lecturas proporcionan información directa o indirecta sobre el número de células diana y/o su muerte, y pueden medirse en diferentes momentos del ensayo. Una reducción del número de células diana y/o un aumento de la muerte de células diana indican la actividad citolítica de las células. Los métodos adecuados para realizar ensayos citolíticos son conocidos en la técnica, e incluyen, entre otros, ensayos de liberación de cromo-51, ensayos de cromo no radiactivo, ensayos de citometría de flujo que utilizan colorantes fluorescentes como éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE), PKH-2 y PKH-26.

[0166] En ciertas divulgaciones, la actividad citolítica dependiente del receptor recombinante, por ejemplo, CAR, se mide incubando la composición celular que contiene células que expresan el receptor recombinante con células diana que expresan un antígeno o un epítipo del mismo unido o reconocido por el receptor recombinante. En ciertas divulgaciones, el receptor recombinante es un CAR. En algunas divulgaciones, las células de la composición celular se incuban con las células diana en una proporción de aproximadamente 10:1, aproximadamente 5:1, aproximadamente 4:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 1:1, aproximadamente 12, aproximadamente 1:3, aproximadamente 1:4, aproximadamente 1:5, aproximadamente 1:6, aproximadamente 1:7, aproximadamente 1:8, aproximadamente 1:9, o aproximadamente 1:10, o en una proporción entre 10:1 y 1:1, 3:1 y 1:3, o 1:1 y 1:10, cada una inclusive. En algunas divulgaciones, las células de la composición celular se incuban con las células diana en una proporción de células CAR+, células CAR+/CD8+ o células Anexina-/CAR+/CD8+ de la composición celular con respecto a las células diana de aproximadamente 10:1, aproximadamente 5:1, aproximadamente 4:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 1:1, aproximadamente 1:2, aproximadamente 1:3, aproximadamente 1:4, aproximadamente 1:5, aproximadamente 1:6, aproximadamente 1:7, aproximadamente 1:8, aproximadamente 1:9, o aproximadamente 1:10, o en una proporción entre 10:1 y 1:1, 3:1 y 1:3, o 1:1 y 1:10, cada una inclusive.

[0167] En ciertas divulgaciones, las células de la composición celular se incuban con las células diana durante hasta o aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 48 horas o más de 48 horas. En algunas

divulgaciones, las composiciones celulares se incuban durante aproximadamente 18 horas, 19 horas, 20 horas, 21 horas, 22 horas, 23 horas o 24 horas. En algunas divulgaciones, entre aproximadamente 1×10^2 y aproximadamente 1×10^4 , entre aproximadamente 1×10^3 y aproximadamente 1×10^5 , entre aproximadamente 1×10^4 y aproximadamente 1×10^6 , entre aproximadamente 1×10^5 y aproximadamente 1×10^7 , entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 1×10^8 , entre aproximadamente 1×10^7 y aproximadamente 1×10^9 , o entre aproximadamente 1×10^8 y aproximadamente 1×10^{10} células de la composición celular, cada una inclusive, se incuban con las células diana. En ciertas divulgaciones, las entre aproximadamente 1×10^2 y aproximadamente 1×10^4 , entre aproximadamente 1×10^3 y aproximadamente 1×10^5 , entre aproximadamente 1×10^4 y aproximadamente 1×10^6 , entre aproximadamente 1×10^5 y aproximadamente 1×10^7 , entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 1×10^8 , entre aproximadamente 1×10^7 y aproximadamente 1×10^9 , o entre aproximadamente 1×10^8 y aproximadamente 1×10^{10} células CAR+, células CAR+/CD8+, o células Anexina-/CAR+/CD8+ de la composición celular, cada una inclusive, se incuban con las células diana.

[0168] En algunas divulgaciones, la medición de la actividad se compara con un control. En ciertas divulgaciones, el control es un cultivo de células diana que no se incuban con la composición celular. En algunas divulgaciones, el control es una medición de una composición celular de control que no contiene células CAR+ que se incuban con las células diana en la misma proporción.

[0169] En ciertas divulgaciones, la medida del ensayo de actividad citolítica es el número de células diana que son viables en un punto temporal durante o al final de la incubación. En ciertas divulgaciones, la medida es una cantidad de un marcador de muerte de la célula diana, por ejemplo, cromo-51, que se libera durante la incubación. En algunas divulgaciones, la medida es una cantidad de muerte de células diana que se determina restando la cantidad de células diana en la coincubación en un momento dado de la cantidad de células diana del control que se incubó solo. En algunas divulgaciones, la medida es el porcentaje de células diana que permanecen en un punto temporal en comparación con la cantidad inicial de células diana. En determinadas divulgaciones, la medida es la cantidad de células eliminadas durante un periodo de tiempo. En ciertas divulgaciones, la medida es la cantidad de células eliminadas por cada célula de la composición celular. En algunas divulgaciones, la medida es la cantidad de células eliminadas por célula, o la cantidad de células eliminadas por un número determinado o referencia de células, por ejemplo, pero no limitado a, la cantidad de células diana eliminadas por 100 células, por 10^3 células, por 10^4 células, por 10^5 células, por 10^6 células, por 10^7 células, por 10^8 células, por 10^9 células, o por 10^{10} células de la composición. En determinadas divulgaciones, la medida es la cantidad de células eliminadas por cada célula CAR+, célula CAR+/CD8+ o célula Anexina-/CAR+/CD8+, o un número de referencia o conjunto de las mismas, de la composición celular. En ciertas divulgaciones, la medida es la cantidad de células eliminadas durante un periodo de tiempo por célula de la composición celular. En determinadas divulgaciones, la medida es la cantidad de células eliminadas durante un periodo de tiempo por células CAR+, células CAR+/CD8+ o células Anexina-/CAR+/CD8+ de la composición celular.

[0170] En algunas divulgaciones, la actividad dependiente del receptor recombinante no es actividad citolítica. En determinadas divulgaciones, la actividad dependiente de CAR+ no es una actividad citolítica.

1. Normas de referencia

[0171] Las divulgaciones particulares contemplan que una medición de una actividad dependiente del receptor recombinante y/o una actividad dependiente de CAR+ puede normalizarse a una medición de referencia, (es decir, una medida de referencia). En determinadas divulgaciones, la medición de referencia es una medición predeterminada, o un valor de la misma, de la actividad. En algunas divulgaciones, la medida de referencia es una media o moda de una pluralidad de composiciones celulares derivadas de diferentes sujetos. En algunas divulgaciones, las composiciones celulares de la pluralidad se derivan de diferentes sujetos y contienen células que expresan el mismo receptor recombinante. En ciertas divulgaciones, el estándar de referencia se deriva de mediciones que se normalizaron o sustrajeron de grupos de control de la misma manera que la medición de la actividad dependiente del receptor recombinante. En divulgaciones particulares, la medida de referencia se deriva de medidas tomadas de diferentes composiciones celulares tomadas bajo las mismas condiciones de ensayo que la medida de la actividad del receptor recombinante. En divulgaciones particulares, la medición de la actividad dependiente del receptor recombinante se normaliza con respecto a una medición de referencia.

[0172] En ciertas divulgaciones la medición de referencia es una media o un modo de mediciones de una pluralidad de composiciones celulares. En ciertas divulgaciones, la medida de referencia se toma de la composición celular que contiene células que expresan el mismo CAR que es expresado por al menos una porción de las células en las composiciones celulares de la pluralidad. En ciertas divulgaciones, la medida de referencia es una media o una mediana de medidas tomadas de dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte, veintiuno, veintidós, veintitrés, veinticuatro, veinticinco, más de veinticinco, más de treinta, más de cuarenta o más de cincuenta composiciones celulares.

[0173] En ciertas divulgaciones, una medición de una actividad específica de receptor recombinante o específica de CAR se toma de una composición celular derivada de un sujeto humano con una enfermedad o afección, y se compara con una medición de referencia. En ciertas divulgaciones, la medida de referencia se toma de composiciones celulares que son composiciones de células T terapéuticas. En ciertas divulgaciones, las composiciones de células T terapéuticas son composiciones celulares que se administraron terapéuticamente a sujetos humanos, por ejemplo, en un ensayo clínico.

En algunas divulgaciones, se conocen los resultados de seguridad y eficacia tras la administración de las composiciones de células T de referencia. En ciertas divulgaciones, el sujeto padece una enfermedad o afección que expresa el antígeno o está asociada a él.

5 **[0174]** En algunas divulgaciones, cada una de las composiciones de células T de referencia se ha administrado a un sujeto. En divulgaciones particulares, se observó la administración de las composiciones de células T de referencia a los sujetos y se determinó que daban lugar a un perfil de seguridad aceptable tras la administración a un sujeto. En determinadas divulgaciones, la administración de las composiciones de células T de referencia no produjo ninguna toxicidad grave. En ciertas divulgaciones, la administración de las composiciones de células T de referencia no produjo
10 ninguna neurotoxicidad grave. En divulgaciones particulares, las composiciones de células T de referencia son todas las composiciones que se asociaron con grado 4 o inferior, grado 3 o inferior, grado 2 o inferior, grado 1 o inferior, o puntuación de grado 0 para neurotoxicidad. En algunas divulgaciones, las composiciones celulares de referencia se asocian con perfiles de seguridad aceptables. En determinadas divulgaciones, el perfil de seguridad aceptable es la ausencia de neurotoxicidad observada de grado 1 o superior, de grado 2 o superior, de grado 3 o superior, o de grado 4 o superior. En
15 ciertas divulgaciones, las composiciones de células T de referencia se asocian con perfiles de seguridad aceptables de ausencia de neurotoxicidad observada de grado 3 o superior. En divulgaciones particulares, las composiciones de células T de referencia se asocian con perfiles de seguridad aceptables de ausencia de neurotoxicidad observada de grado 3 o superior.

20 **[0175]** En ciertas divulgaciones, se ha observado o determinado que cada una de las composiciones terapéuticas de células T de referencia produce una eficacia deseada tras la administración a un sujeto. En ciertas divulgaciones, el sujeto tiene una enfermedad o afección que expresa o está asociada con el antígeno como los sujetos a los que se administraron las composiciones de células T de referencia. En divulgaciones particulares, se ha observado o determinado que cada una de las composiciones terapéuticas de células T de referencia da lugar a una respuesta completa (CR).

25 **[0176]** En algunas divulgaciones, la medición de una actividad dependiente del receptor recombinante es una medición de la producción o secreción de uno o más factores solubles. En ciertas divulgaciones, los factores solubles son una o más citocinas. En determinadas divulgaciones, la actividad específica del CAR es la secreción de dos o más citocinas. En ciertas divulgaciones, la medición de la secreción dependiente del receptor recombinante de dos o más citocinas se toma
30 de una composición celular y se normaliza a mediciones de referencia de las citocinas correspondientes. En algunas divulgaciones, las mediciones de dos o más normalizados se normalizan con respecto a las mediciones de referencia. En algunas divulgaciones, las mediciones normalizadas se combinan en un único valor compuesto.

35 **[0177]** En divulgaciones particulares, la actividad específica de CAR es la secreción de IL-2, IFN-gamma, TNF-alfa, o una combinación de los mismos. En ciertas divulgaciones, la medición de la secreción dependiente de CAR de IL-2, IFN-gamma, TNF-alfa, o la combinación de los mismos, se toma de una composición celular y se normaliza con respecto a las mediciones de referencia de las citocinas correspondientes. En algunas divulgaciones, las mediciones de dos o más de IL-2, IFN-gamma y TNF-alfa se normalizan con respecto a unas mediciones de referencia. En algunas divulgaciones, las mediciones normalizadas se combinan en un único valor.

40 **[0178]** Las divulgaciones particulares contemplan que cuando la medición de referencia se deriva de composiciones de referencia que se asociaron con perfiles de seguridad aceptables y/o una eficacia deseada, una medición normalizada que está cerca de 1 tendrá una alta probabilidad de también estar asociada con perfiles de seguridad aceptables y/o una eficacia deseada. Ciertas divulgaciones contemplan que una medición de una composición de células T tendrá una alta
45 probabilidad de estar asociada con perfiles de seguridad aceptables y/o una eficacia deseada, si la relación de la medición con la medición de referencia es cercana o aproximadamente 1: 1.

[0179] Las divulgaciones particulares contemplan que se ha observado que la secreción dependiente de CAR+ de citoquinas particulares no indica o correlaciona, o correlaciona significativamente, con un evento adverso o resultado o probabilidad de toxicidad. Para estas citocinas, una medición de la secreción dependiente de CAR sí predice la seguridad o eficacia de una administración terapéutica la composición de células T. En algunas divulgaciones, las mediciones de la secreción dependiente de CAR de citocinas que no se correlacionan o indican seguridad o eficacia se miden y se comparan o normalizan con una medición de referencia derivada de mediciones de citocinas correspondientes tomadas de composiciones celulares derivadas de otros sujetos. En algunas divulgaciones, las mediciones de la secreción de
50 citocinas dependientes de CAR que no se correlacionan ni indican seguridad o eficacia se comparan con las mediciones de referencia correspondientes para determinar si la composición celular produce respuestas variables a la estimulación dependiente de CAR. En algunas divulgaciones, la secreción de no se considera correlativa ni indicativa de seguridad o eficacia. Las divulgaciones particulares contemplan que la normalización de una o más mediciones de la secreción de citocinas dependientes de CAR de IL-4, IL-5, IL-10 o IL-13, o un compuesto de las mismas, es útil para determinar o
55 confirmar la variabilidad y fiabilidad de las mediciones tomadas de la composición celular.

III. MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE UNA COMPOSICIÓN TERAPÉUTICA DE CÉLULAS T

65 **[0180]** Se divulgan en el presente documento métodos que implican caracterizar o evaluar la potencia y/o seguridad y/o actividad y/o eficacia de una composición terapéutica, en algunas divulgaciones y composición de células T terapéuticas antes o simultáneamente con o después de la administración de una o más dosis unitarias de una composición de células

T terapéuticas a un sujeto que tiene una enfermedad o afección. En algunas divulgaciones, los métodos divulgados evalúan el riesgo de desarrollar un evento adverso tras la administración de una composición de células T descrita en el presente documento. En algunas divulgaciones, una composición de células T no se libera para su posterior administración a un sujeto si se determina que la composición está fuera de un intervalo de seguridad determinado. En algunas divulgaciones, los métodos divulgados proporcionan un ensayo de liberación que puede evaluar composiciones celulares para determinar, entre otros aspectos, si la composición administrada a un sujeto, si es probable que se correlacione con un riesgo de desarrollar una toxicidad, tal como neurotoxicidad grave y/o si es probable que sea eficaz. En algunas divulgaciones, se recomienda no administrar una composición de células T a un sujeto y/o se altera o ajusta la dosis unitaria que debe administrarse a un sujeto si B está por encima del USL. Si B está por debajo del LSU, puede liberarse un producto para su tratamiento.

[0181] En algunas divulgaciones, una muestra que se va a evaluar utilizando los métodos descritos en el presente documento se toma o deriva de una composición de células T que comprende células T derivadas de un sujeto que padece una enfermedad o afección y transducidas con un ácido nucleico que codifica un receptor recombinante, opcionalmente un receptor de antígeno quimérico (CAR), que se une específicamente a un antígeno asociado con una enfermedad o afección. En algunas divulgaciones, los ensayos aquí descritos determinan B para la composición celular, donde B es el valor de un parámetro, o un múltiplo o transformación del mismo, que indica o se correlaciona con el grado de una actividad dependiente del receptor recombinante en la composición dada. También se divulgan en el presente documento métodos de ensayo de una composición terapéutica de células T que comprenden la evaluación de una muestra de una composición de células T que comprende células T que comprenden un receptor recombinante que se une específicamente a un antígeno asociado con una enfermedad o afección para la potencia de la composición de células basada en B en la que B es el valor de un parámetro, o un múltiplo o transformación del mismo, que indica o se correlaciona con el grado de actividad en la composición dada. En algunas divulgaciones, los métodos divulgados evalúan además la potencia de una composición celular basada en B y/o evalúan si la composición está por encima de un LSL y/o está por debajo de un USL para B.

[0182] En algunas divulgaciones si B está por encima del USL, la dosis unitaria a administrar a un sujeto se altera o ajusta, en donde la dosis unitaria ajustada contiene un número objetivo de células o un número objetivo de unidades de referencia (RUs) de la composición de células T, en donde RU en una composición dada se define por la fórmula: $RU = A \times B$, donde A es el número de células, o múltiplo, fracción o transformación del mismo, de células de un fenotipo presente en la composición dada o es la media o media ponderada del número de células, o múltiplo, fracción o transformación del mismo, de dos o más fenotipos en la composición dada; y B es el valor de un parámetro, o una fracción o múltiplo o transformación del mismo, que indica o se correlaciona con el grado de una actividad dependiente del receptor recombinante, opcionalmente dependiente de CAR, en la composición dada.

[0183] En algunas divulgaciones, el parámetro es una medida de uno o más factores o un valor normalizado de los mismos. En algunas divulgaciones, el indicador de producción se mide en un ensayo de tinción de citocinas intracelulares, que comprende incubar una muestra de la composición de células T con un agente policlonal, un agente específico de antígeno o un agente que se une al receptor recombinante. En algunas divulgaciones, la medida se realiza en un ensayo que implica el cultivo o incubación durante un tiempo fijo, opcionalmente 24 horas, de una composición dada o muestra de la misma en presencia del antígeno, células que expresan el antígeno y/o agente que se une específicamente al receptor recombinante, opcionalmente el CAR. En algunas divulgaciones, el ensayo es un ELISA.

[0184] En algunas divulgaciones, la medida del factor es una medida o nivel indicativo de la concentración, concentración relativa, cantidad o cantidad relativa del factor, la cantidad o cantidad relativa del factor por unidad de células de entrada de la composición dada, la cantidad o cantidad relativa del factor por unidad de células de entrada de la composición dada por unidad de tiempo, opcionalmente una hora. En algunas divulgaciones, el uno o más factores es uno o una combinación de factores solubles, opcionalmente una o una combinación de citoquinas, quimioquinas o receptores solubles, opcionalmente receptores costimuladores solubles.

[0185] En algunas divulgaciones, el parámetro es una medida de uno o más factores o un valor normalizado de los mismos. En algunas divulgaciones, la actividad dependiente del receptor recombinante es una medida de la producción o acumulación de una o más de IL-1, IL-1 β , IL-2, sIL-2Ra, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL 27, IL-33, IL-35, TNF, TNF alfa, CXCL2, CCL2, CCL3, CCL5, CCL17, CCL24, PGD2, LTB4, interferón gamma (IFN- γ), factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-1a, MIP-1b, Flt-3L, fractalquina y/o IL-5. En ciertas divulgaciones, la actividad dependiente de CAR producción o secreción de una citoquina Th17. En algunas divulgaciones, la citoquina Th17 es GMCSF. En algunas divulgaciones, la actividad dependiente del receptor recombinante es una medida de la producción o acumulación de una citocina Th2, en la que la citocina Th2 es IL-4, IL-5, IL-10, o IL-13. En ciertas divulgaciones, B es indicativo de la producción y/o secreción de una citocina proinflamatoria como, interleucinas (IL), interleucina-1-beta (IL-1), interleucina-3 (IL-3), interleucina-5 (IL-5), interleucina-6 (IL-6), interleucina-13 (IL-13), factor de necrosis tumoral (TNF), ligando 2 de la quimiocina CXC (CXCL2), ligando 2 de la quimiocina CC (CCL2), ligando 3 de la quimiocina CC (CCL3), ligando 5 de la quimiocina CC (CCL5), ligando 17 de la quimiocina CC (CCL17), ligando 24 de la quimiocina CC (CCL24), prostaglandina D2 (PGD2) y leucotrieno B4 (LTB4), así como IL-33. En algunas divulgaciones, la actividad dependiente del receptor recombinante es una medida de la producción o acumulación de una interleucina y/o un miembro de la familia TNF como IL-1, IL-6, IL-8 e IL-18, TNF-alfa o una combinación de los mismos. En divulgaciones particulares, la actividad dependiente del receptor recombinante es una

medida de la producción o acumulación de IL-2, IFN-gamma, TNF-alfa o una combinación de los mismos. En algunas divulgaciones, el uno o más factores son una de o una combinación de citoquinas proinflamatorias, citoquinas Th2 y citoquinas Th17. En algunas divulgaciones, el uno o más factores son uno de o una combinación de IL-2, IFN-gamma, TNF-alfa, IL4, IL-5, IL-10, IL-13, GM-CSF, sCD137, MIP1a y M1Pb. En algunas divulgaciones, el uno o más factores son uno de o una combinación de IL-2, IFN-gamma, TNF-alfa e IL-10.

[0186] En algunas divulgaciones, el uno o más factores es uno o una combinación de factores solubles, opcionalmente una o una combinación de citoquinas, quimioquinas o receptores solubles, opcionalmente receptores costimuladores solubles. En algunas divulgaciones, el parámetro es una media aritmética o media geométrica de la medida de los dos o más factores. En algunas divulgaciones, el parámetro es una media aritmética o una media geométrica de una medida, opcionalmente cantidad o concentración, de al menos dos de TNF-alfa, IFN-gamma e IL-2 o de TNF-alfa, IFN-gamma e IL-2. En algunas divulgaciones, el parámetro es el valor normalizado de la medida, donde la normalización es en comparación con una medida de referencia del factor.

[0187] En algunas divulgaciones, A es el número de células, o múltiplo o fracción o transformación de las mismas, de un fenotipo dado presente en la composición dada. En algunas divulgaciones, A es la media o media ponderada del número de células, o múltiplo, fracción o transformación de las mismas, de dos o más fenotipos en la composición de administración, donde opcionalmente los dos o más fenotipos comprenden un primer fenotipo que comprende CD8+ y un segundo fenotipo que comprende CD4+.

[0188] En algunas divulgaciones, el número objetivo de RU de referencia está en o por debajo de un número umbral de RU, en el que la dosis unitaria ajustada no contiene más que el número umbral de RU. En algunas divulgaciones, el número objetivo de unidades es inferior a un número umbral de unidades, que opcionalmente es un número de seguridad de unidades de referencia, en el que, el número de seguridad de unidades de referencia es, con respecto a un grupo de sujetos analizados tras el tratamiento con una composición terapéutica de células T que comprende las células T que expresan el receptor recombinante, opcionalmente el CAR, el número más bajo de unidades de referencia de la terapia administrada a un sujeto entre aquellos sujetos del grupo que pasaron a desarrollar un acontecimiento adverso. En algunas divulgaciones, el acontecimiento adverso es un acontecimiento adverso grave, opcionalmente neurotoxicidad grave, opcionalmente de grado 4 o superior o de grado 5 o neurotoxicidad de grado 3 al menos prolongada. En algunas divulgaciones, el número objetivo de unidades de referencia es menor que el número de seguridad de unidades de referencia en una cantidad correspondiente a un factor de seguridad y/o en una cantidad dentro de un intervalo de 1,5 a 3 veces, opcionalmente aproximadamente 2 veces, o en una cantidad que es un múltiplo de una desviación estándar de un grupo de sujetos que no desarrollaron el acontecimiento adverso, opcionalmente neurotoxicidad de grado 0-2, opcionalmente en el que el múltiplo está dentro de un intervalo de 1,5 a 3 veces. En algunas divulgaciones, el número objetivo de unidades de referencia es menor que el número de seguridad de unidades de referencia en una cantidad correspondiente a un factor de seguridad. En ciertas divulgaciones, el factor de seguridad se encuentra dentro de un intervalo de 0,5 a 10 veces, 1,0 a 5,0 veces, o 1,5 a 3 veces, y/o en, aproximadamente, o al menos 1 vez, 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces o 3 veces del número de seguridad. En determinadas divulgaciones, el factor de seguridad es inferior al número de seguridad. En algunas divulgaciones, el factor de seguridad es, con respecto a un grupo de sujetos analizados tras el tratamiento con una composición terapéutica de células T que comprende las células T que expresan el receptor recombinante, tal como un CAR, un múltiplo de una desviación estándar de la media, por ejemplo, la media, de la dosis en unidades de referencia administrada a los sujetos del grupo que no desarrollaron el acontecimiento adverso, por ejemplo, los sujetos del grupo que experimentaron neurotoxicidad de grado 2 o inferior. En algunas divulgaciones, el factor de seguridad se encuentra dentro de un intervalo de 0,5 a 10 veces, 1,0 a 5,0 veces, o 1,5 a 3 veces, y/o en, aproximadamente, o al menos 1 vez, 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces o 3 veces de la desviación estándar. En algunas divulgaciones, el número o dosis de unidades de referencia que está por debajo del número de seguridad en una cantidad correspondiente al factor de seguridad incluye números o dosis de unidades de referencia que se asocian con una respuesta, por ejemplo, una CR, como con respecto a un grupo de sujetos que pasaron a desarrollar una respuesta, por ejemplo, una CR.

[0189] En algunas divulgaciones, el número objetivo de unidades de referencia está en o por encima de un número de eficacia de referencia de unidades de referencia, en donde el número de eficacia de referencia es, con respecto a un grupo de sujetos analizados después del tratamiento con una composición terapéutica de células T que comprende el receptor recombinante, opcionalmente el CAR, un número de unidades de la terapia administrada a uno o más sujetos entre el grupo que exhibieron un resultado terapéutico deseado, opcionalmente una respuesta parcial o una respuesta completa (CR).

[0190] En algunas divulgaciones, la dosis unitaria ajustada es menor que, opcionalmente menor que 1,5 veces, menos de 2 veces, menos de 3 veces, menos de 4 veces, la dosis unitaria media de un grupo de sujetos tratados con una composición de células T terapéuticas que comprende las células T que expresan el receptor recombinante, opcionalmente el CAR.

[0191] En algunas divulgaciones, una muestra de la composición de células T, opcionalmente una muestra criopreservada, se evalúa después de la administración de la composición de células T al sujeto. En algunas divulgaciones, si B está por encima del USL, se determina que el sujeto está en riesgo de toxicidad. En algunas divulgaciones, si B está por encima del USL, un sujeto al que se le administra la composición se monitoriza y/o se trata

con un agente para mejorar o reducir la probabilidad de un resultado de toxicidad o síndrome de liberación de citoquinas tras la administración de la composición celular y opcionalmente antes del desarrollo de un signo o síntoma del resultado de toxicidad.

[0192] También se divulga en el presente documento un método de evaluación de un riesgo de toxicidad para una composición terapéutica de células T, comprendiendo el método: (a) evaluar una muestra de una composición de células T que se ha administrado a un sujeto para unidades de referencia (RU) dentro de un intervalo dado, comprendiendo la composición de células T células T que comprenden un receptor recombinante que se une específicamente a un antígeno asociado con una enfermedad o afección, donde RU en una composición dada se define por la fórmula: $RU = A \times B$, donde: A es el número de células, o múltiplo, fracción o transformación del mismo, de células de un fenotipo presente en la composición dada o es la media o media ponderada del número de células, o múltiplo, fracción o transformación del mismo, de dos o más fenotipos en la composición dada; y B es el valor de un parámetro, o una fracción o múltiplo o transformación del mismo, que indica o se correlaciona con el grado de una actividad dependiente del receptor recombinante, opcionalmente dependiente del CAR, en la composición dada; y (b) comparar las RU con un número de RU de seguridad de referencia, en el que la comparación indica si el sujeto está o no en riesgo de desarrollar un acontecimiento adverso, opcionalmente un acontecimiento adverso grave, opcionalmente neurotoxicidad grave de grado 4 o superior, o de grado 5, o neurotoxicidad de grado 3 al menos prolongada. En algunas divulgaciones, A es el número de células, o múltiplo o fracción o transformación de las mismas, de un fenotipo dado presente en la composición dada. En algunas divulgaciones, A es la media o media ponderada del número de células, o múltiplo, fracción o transformación de las mismas, de dos o más fenotipos en la composición dada, donde opcionalmente los dos o más fenotipos comprenden un primer fenotipo que comprende CD8+ y un segundo fenotipo que comprende CD4+. En algunas divulgaciones, el número de seguridad de referencia de RU es, con respecto a un grupo de sujetos analizados tras el tratamiento con una composición terapéutica de células T que comprende las células T que expresan el receptor recombinante, opcionalmente el CAR, el número más bajo de unidades de referencia de la terapia administrada a un sujeto entre aquellos sujetos del grupo que pasaron a desarrollar el acontecimiento adverso. En algunas divulgaciones, si la comparación indica que el EF está por encima del EF de seguridad de referencia, el sujeto al que se administra la composición se monitoriza y/o se trata con un agente para mejorar o reducir la probabilidad de un resultado de toxicidad o síndrome de liberación de citoquinas tras la administración de la composición celular y opcionalmente antes del desarrollo de un signo o síntoma del resultado de toxicidad.

[0193] También se divulga en el presente documento un método para producir una composición terapéutica que comprende una dosis unitaria de una composición de células T, el método comprende: (a) ensayar una composición de células T que comprende células T derivadas de un sujeto que tiene una enfermedad o afección y transducidas con un ácido nucleico que codifica un receptor recombinante, opcionalmente un receptor de antígeno quimérico (CAR), que se une específicamente a un antígeno asociado con una enfermedad o afección, en donde el ensayo determina B para la composición de células, en donde B es el valor de un parámetro, o un múltiplo o transformación del mismo, que indica o se correlaciona con el grado de una actividad dependiente del receptor recombinante, opcionalmente dependiente de CAR, en la composición dada; y (b) llenar un recipiente, p. ej., un vial, con toda o una porción de la composición y opcionalmente otra solución para lograr una dosis unitaria de la composición de células T, en la que la dosis unitaria contiene un número objetivo de unidades de referencia (RU) de la composición de células T, en la que las RU en una composición dada se definen por la fórmula: $RU = A \times B$, donde A es el número de células, o múltiplo, fracción o transformación del mismo, de células de un fenotipo presente en la composición dada o es la media o media ponderada del número de células, o múltiplo, fracción o transformación del mismo, de dos o más fenotipos en la composición dada;.

[0194] También se divulga en el presente documento un método para producir una composición terapéutica que comprende una dosis unitaria de una composición de células T, comprendiendo el método llenar un recipiente, por ejemplo, un vial, con toda o una porción de una composición de células T que comprende células T que comprenden un receptor recombinante que se une específicamente a un antígeno asociado con una enfermedad o afección, y opcionalmente otra solución, para lograr una dosis unitaria de la composición de células T, en la que la dosis unitaria contiene un número objetivo de unidades de referencia (RU) de la composición de células T, en la que RU en una composición dada se define por la fórmula: $RU = A \times B$, donde A es el número de células, o múltiplo, fracción o transformación del mismo, de un fenotipo presente en la composición dada o es la media o media ponderada del número de células, o múltiplo, fracción o transformación del mismo, de dos o más fenotipos en la composición dada; y B es el valor de un parámetro, o múltiplo o transformación del mismo, que indica o se correlaciona con el grado de actividad dependiente de un receptor recombinante, opcionalmente dependiente de CAR, en la composición dada. En algunas divulgaciones, A es el número de células, o múltiplo o fracción o transformación de las mismas, de un fenotipo dado presente en la composición dada. En algunas divulgaciones, A es la media o media ponderada del número de células, o múltiplo, fracción o transformación de las mismas, de dos o más fenotipos en la composición dada, donde opcionalmente los dos o más fenotipos comprenden un primer fenotipo que comprende CD8+ y un segundo fenotipo que comprende CD4+.

[0195] En algunas divulgaciones, A es el número de células de un fenotipo presente en la composición dada y B es el valor de un parámetro que indica o se correlaciona con el grado de actividad dependiente del receptor recombinante en la composición dada. En algunas divulgaciones, A y/o B es una transformación del número o valor, respectivamente, donde la transformación comprende una transformación logarítmica, transformación de potencia o transformación logit. En algunas divulgaciones, A es un número de células de un fenotipo presente en la composición dada y B es un múltiplo

o transformación del valor del parámetro que indica o se correlaciona con el grado de actividad dependiente de CAR en la composición de células T dada, opcionalmente en la que B es una transformación logarítmica del valor. En algunas divulgaciones, la transformación logarítmica es un logaritmo común ($\log_{10}(x)$), un logaritmo natural ($\ln(x)$) o un logaritmo binario ($\log_2(x)$).

[0196] En algunas divulgaciones, A es el número de células viables en la composición y/o es el número de células que no son apoptóticas, no exhiben un factor indicativo de apoptosis temprana o de apoptosis, no están en las etapas tempranas de apoptosis, o no están en las etapas tardías de apoptosis, y/o es el número de células de un estado de diferenciación particular, y/o es el número de células que tienen un atributo de memoria/tallo o es un múltiplo o transformación de los mismos. En algunas divulgaciones, el fenotipo comprende ausencia de un factor indicativo de apoptosis o uno o más pasos en una cascada o vía apoptótica, opcionalmente expresión de un marcador de apoptosis. En algunas divulgaciones, el fenotipo comprende la expresión negativa de un marcador de apoptosis, opcionalmente un marcador de apoptosis temprana o de apoptosis tardía. En algunas divulgaciones, el marcador de apoptosis es la fosfatidilserina superficial y/o se detecta con Anexina V, o es una forma activa o proforma de una caspasa, opcionalmente una forma activa o proforma de la caspasa 3. En algunas divulgaciones, el fenotipo comprende Anexina-. En algunas divulgaciones, A es el número total de células T, el número total de células CD3+, el número total de células CD4+ o CD8+, el número total de células CD3+CAR+, el número total de células CD8+CAR+, el número total de células CD4+CAR+, o el número total de células vivas o viables de cualquiera de los anteriores, o un valor múltiple o transformado de los mismos. En algunas divulgaciones, A es el número total de células CD3+, el número total de células CD8+, el número total de células CD3+CAR+, el número total de células CD8+CAR+, o el número total de células vivas o viables de cualquiera de los anteriores, o un valor múltiple o transformado de los mismos. En algunas divulgaciones, A es el número total de células con marcador apoptótico negativo (-) que son célulasCD3+ CAR+, el número total de células con marcador apoptótico negativo (-) que son célulasCD4+ CAR+, el número total de células con marcador apoptótico negativo (-) que son células CD8+ CAR+, o un valor múltiple o transformado de los mismos, en el que el marcador apoptótico es la anexina V o la caspasa. A es el número total de células Anexina- CD3+ CAR+, el número total de células Anexina- CD4+ CAR+, el número total de células Anexina- CD8+ CAR+, o un valor múltiple o transformado de los mismos. En algunas divulgaciones, A es el número total de células Anexina-CD3+ CAR+ o el número total de células Anexina- CD8+ CAR+.

[0197] En algunas divulgaciones, el fenotipo comprende la expresión positiva de un marcador de superficie que es uno o más de CD3, CD4 o CD8 y/o comprende la expresión positiva del receptor recombinante, opcionalmente el CAR, o un marcador sustituto de la expresión del receptor recombinante. En algunas divulgaciones, el fenotipo es CD3+ CAR, CD4+/CAR+, CD8+/CAR+. En algunas divulgaciones, el fenotipo comprende un indicador de producción de una o una combinación de citocinas, opcionalmente no específicas para el antígeno o el receptor recombinante y/o que se produce policlonalmente, donde la una o más citocinas es IL-2, IL-13, IL-17, IFN-gamma o TNF-alfa. En algunas divulgaciones, el indicador de producción se mide en un ensayo, opcionalmente un ensayo de tinción de citocinas intracelulares, que comprende incubar una muestra de la composición de células T con un agente policlonal, un agente específico de antígeno o un agente que se une al receptor recombinante, opcionalmente CAR. En algunas divulgaciones, el agente es o comprende PMA e ionomicina o es o comprende un agonista del receptor de células T o del complejo receptor de células T. En algunas divulgaciones, el fenotipo comprende la expresión negativa de un marcador de activación, en el que el marcador de activación se selecciona entre CD25, CD127, LAG3, Ki67 y combinaciones de los mismos. En algunas divulgaciones, el fenotipo comprende la expresión negativa de un marcador de agotamiento, en el que el marcador de agotamiento es un producto génico PD1 o FOXP3 o una combinación de los mismos. En algunas divulgaciones, el fenotipo comprende un fenotipo ingenuo o un fenotipo de memoria, opcionalmente en el que el fenotipo de memoria comprende un fenotipo de memoria efector T, un fenotipo de memoria central T o un fenotipo de memoria efector T que expresa CD45RA (Temra).

[0198] En algunas divulgaciones, la actividad dependiente del receptor recombinante es una medida de la producción o acumulación de una citoquina proinflamatoria, opcionalmente, una de o una combinación de TNF-alfa, IFN-gamma, IL-2 e IL-10. En algunas divulgaciones, la medida de referencia es la media de la medida entre una pluralidad, opcionalmente al menos 10, al menos 15, al menos 20, de composiciones de células T terapéuticas de referencia que comprenden el receptor de antígeno quimérico (CAR) en las que: (i) se ha observado o determinado que cada una de las composiciones terapéuticas de células T de referencia da lugar a un perfil de seguridad aceptable tras la administración a un sujeto, opcionalmente en el que el sujeto tiene una enfermedad o afección que expresa o está asociada con el antígeno; y/o (ii) se ha observado o determinado que cada una de las composiciones terapéuticas de células T de referencia da lugar a una eficacia deseada tras la administración a un sujeto, opcionalmente en el que el sujeto tiene una enfermedad o afección que expresa o está asociada con el antígeno.

[0199] En algunas divulgaciones particulares, el parámetro es el valor normalizado de la medida, donde la normalización es en comparación con una medida de referencia del factor. En algunas divulgaciones, la medida de referencia es la media de la medida entre una pluralidad, opcionalmente al menos 10, al menos 15, al menos 20, de composiciones de células T terapéuticas de referencia que comprenden el receptor de antígeno quimérico (CAR) en las que: (i) se ha observado o determinado que cada una de las composiciones terapéuticas de células T de referencia da lugar a un perfil de seguridad aceptable tras la administración a un sujeto, opcionalmente en el que el sujeto tiene una enfermedad o afección que expresa o está asociada con el antígeno; y/o (ii) se ha observado o determinado que cada una de las composiciones terapéuticas de células T de referencia da lugar a una eficacia deseada tras la administración a un sujeto, opcionalmente en el que el sujeto tiene una enfermedad o afección que expresa o está asociada con el antígeno. En

algunas divulgaciones, el perfil de seguridad aceptable es la ausencia de neurotoxicidad observada de grado 2 o superior, o la ausencia de neurotoxicidad de grado 3 o superior.

[0200] En algunas divulgaciones, el perfil de seguridad aceptable es la ausencia de neurotoxicidad observada de grado 3 o superior. En algunas divulgaciones, la eficacia es una respuesta parcial o una respuesta completa (CR). En algunas divulgaciones, la medida de referencia es la medida, por el mismo ensayo, del factor en una composición de células T de referencia producida por el mismo método que la composición de células T terapéuticas pero que no expresa el receptor recombinante, opcionalmente el CAR, que no reconoce específicamente el antígeno y/o que no expresa ningún receptor recombinante, opcionalmente cualquier CAR. En algunas divulgaciones, el parámetro se normaliza para controlar la variación específica del paciente de la medida de uno o más factores. En algunas divulgaciones, el parámetro es un valor normalizado de la medida del factor, comparado con la misma medida en el mismo ensayo, de un factor de control, en el que se sabe que el nivel del factor de control en una composición de células T terapéuticas no indica, o se ha observado que no indica, o correlaciona o correlaciona significativamente con un acontecimiento adverso o resultado de toxicidad o probabilidad o riesgo del mismo, en el que el acontecimiento adverso o resultado de toxicidad opcionalmente es neurotoxicidad grave. En algunas divulgaciones, el factor de control es o comprende un factor que no está estadísticamente correlacionado y/o no se correlaciona con el desarrollo del acontecimiento adverso entre una pluralidad de sujetos que desarrollaron el acontecimiento adverso tras la administración de la composición de células T, opcionalmente el factor de control es uno de o una combinación de IL-5, IL-13, GM-CSF, e IL-6, opcionalmente en el que la medida del factor de control es una media aritmética o media geométrica de dos o más de los anteriores.

[0201] En algunas divulgaciones, el parámetro no comprende la actividad citolítica o una medida de la misma. En algunas divulgaciones, el parámetro no comprende la actividad citolítica dependiente del receptor recombinante o específica del antígeno o una medida de la misma.

[0202] En algunas divulgaciones particulares, el fenotipo es células CD8+ CAR+ o células Anexina-CD8+ CAR+; y el parámetro es una medida de una citocina proinflamatoria, que opcionalmente es una de o una combinación de TNF-alfa, IL-2 e IFN-gamma, o es un valor normalizado de las mismas.

[0203] En algunas divulgaciones, el evento adverso es neurotoxicidad de grado 4 o 5 y el valor umbral: es aproximadamente $1,75 \times 10^7$ si A es negativo para el marcador apoptótico (-) y CD8+CAR+ y B es TNF-alfa o un valor normalizado del mismo; es aproximadamente $2,19 \times 10^7$ si A es CD8+CAR+ y B es TNF-alfa o un valor normalizado del mismo; es aproximadamente $1,25 \times 10^7$ si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es IFN-gamma o un valor normalizado del mismo; es aproximadamente $1,56 \times 10^7$ si A es CD8+CAR+ y B es IFN-gamma o un valor normalizado del mismo; es aproximadamente $1,5 \times 10^7$ si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es IL-2 o un valor normalizado del mismo; es aproximadamente $1,88 \times 10^7$ si A es CD8+CAR+ y B es IL-2 o un valor normalizado del mismo; es aproximadamente $1,5 \times 10^7$ si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es TNF-alfa e IFN-gamma o un valor normalizado del mismo; es aproximadamente $1,88 \times 10^7$ si A es CD8+CAR+ y B es TNF-alfa e IFN-gamma o un valor normalizado del mismo; es aproximadamente $2,0 \times 10^7$ si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es TNF-alfa e IL-2 o un valor normalizado del mismo; es aproximadamente $2,5 \times 10^7$ si A es CD8+CAR+ y B es TNF-alfa e IL-2 o un valor normalizado del mismo; es aproximadamente $1,25 \times 10^7$ si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es IFN-gamma e IL-2 o un valor normalizado del mismo; es aproximadamente $1,56 \times 10^7$ si A es CD8+CAR+ y B es IFN-gamma e IL-2 o un valor normalizado del mismo; es aproximadamente $1,75 \times 10^7$ si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es TNF-alfa, IFN-gamma e IL-2 o un valor normalizado del mismo; es aproximadamente $2,19 \times 10^7$ si A es CD8+CAR+ y B es TNF-alfa, IFN-gamma e IL-2 o un valor normalizado del mismo, opcionalmente donde el marcador de apoptosis es Anexina V o Caspasa 3 activa.

[0204] En algunas divulgaciones, el evento adverso es neurotoxicidad de grado 4 o 5 y el intervalo dado de las unidades de referencia objetivo: está entre aproximadamente $2,0 \times 10^5$ y $1,75 \times 10^7$, inclusive, si A es negativo para el marcador apoptótico (-) y CD8+CAR+ y B es TNF-alfa o un valor normalizado del mismo; está entre aproximadamente $2,5 \times 10^5$ y $2,19 \times 10^7$, inclusive, si A es CD8+CAR+ y B es TNF-alfa o un valor normalizado del mismo; está entre aproximadamente 4×10^5 y $1,25 \times 10^7$, inclusive, si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es IFN-gamma o un valor normalizado del mismo; está entre aproximadamente 5×10^5 y $1,56 \times 10^7$, inclusive, si A es CD8+CAR+ y B es IFN-gamma o un valor normalizado del mismo; está entre aproximadamente $2,0 \times 10^5$ y $1,5 \times 10^7$, inclusive, si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es IL-2 o un valor normalizado del mismo; está entre aproximadamente $2,5 \times 10^5$ y $1,88 \times 10^7$, inclusive, si A es CD8+CAR+ y B es IL-2 o un valor normalizado del mismo; está entre aproximadamente $3,0 \times 10^5$ y $1,5 \times 10^7$, inclusive, si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es TNF-alfa e IFN-gamma o un valor normalizado del mismo; está entre aproximadamente $3,75 \times 10^5$ y $1,88 \times 10^7$, inclusive, si A es CD8+CAR+ y B es TNF-alfa e IFN-gamma o un valor normalizado del mismo; está entre aproximadamente $3,0 \times 10^5$ y $2,0 \times 10^7$, inclusive, si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es TNF-alfa e IL-2 o un valor normalizado del mismo; está entre aproximadamente $3,75 \times 10^5$ y $2,5 \times 10^7$, inclusive, si A es CD8+CAR+ y B es TNF-alfa e IL-2 o un valor normalizado del mismo; está entre aproximadamente $4,0 \times 10^5$ y $1,25 \times 10^7$, inclusive, si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es IFN-gamma e IL-2 o un valor normalizado del mismo; está entre aproximadamente $5,0 \times 10^5$ y $1,56 \times 10^7$, inclusive, si A es CD8+CAR+ y si B es IFN-gamma e IL-2 o un valor normalizado del mismo; está entre aproximadamente $4,0 \times 10^5$ y $1,75 \times 10^7$, inclusive, si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es TNF-alfa, IFN-gamma e IL-2 o un valor normalizado del mismo; está entre aproximadamente $5,0 \times$

10^5 y $2,19 \times 10^7$, inclusive, si A es CD8+CAR+ y si B es TNF-alfa, IFN-gamma e IL-2 o un valor normalizado del mismo, opcionalmente donde el marcador de apoptosis es Anexina V o Caspasa 3 activa.

[0205] En algunas divulgaciones, el evento adverso es al menos neurotoxicidad prolongada de grado 3 y el valor umbral es aproximadamente $1,0 \times 10^6$ si A es negativo para el marcador apoptótico (-) y CD8+CAR+ y B es TNF-alfa o un valor normalizado del mismo; es aproximadamente $1,25 \times 10^6$ si A es CD8+CAR+ y B es TNF-alfa o un valor normalizado del mismo; es aproximadamente $2,0 \times 10^6$ si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es IFN-gamma o un valor normalizado del mismo; es aproximadamente $2,5 \times 10^6$ si A es CD8+CAR+ y B es IFN-gamma o un valor normalizado del mismo; es aproximadamente $3,0 \times 10^6$ si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es IL-2 o un valor normalizado del mismo; es aproximadamente $3,75 \times 10^6$ si A es CD8+CAR+ y B es IL-2 o un valor normalizado del mismo; es aproximadamente $1,5 \times 10^6$ si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es TNF-alfa e IFN-gamma o un valor normalizado del mismo; es aproximadamente $1,88 \times 10^6$ si A es CD8+CAR+ y B es TNF-alfa e IFN-gamma o un valor normalizado del mismo; es aproximadamente $2,5 \times 10^6$ si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es TNF-alfa e IL-2 o un valor normalizado del mismo; es aproximadamente $3,12 \times 10^6$ si A es CD8+CAR+ y B es TNF-alfa e IL-2; o un valor normalizado del mismo es aproximadamente $3,0 \times 10^6$ si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es IFN-gamma e IL-2 o un valor normalizado del mismo; es aproximadamente $3,75 \times 10^6$ si A es CD8+CAR+ y B es IFN-gamma e IL-2 o un valor normalizado del mismo; es aproximadamente $2,0 \times 10^6$ si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es TNF-alfa, IFN-gamma e IL-2 o un valor normalizado del mismo; es aproximadamente $2,5 \times 10^6$ si A es CD8+CAR+ y B es TNF-alfa, IFN-gamma e IL-2 o un valor normalizado del mismo, opcionalmente donde el marcador de apoptosis es Anexina V o Caspasa 3 activa.

[0206] En algunas divulgaciones, el evento adverso es al menos de neurotoxicidad prolongada de grado 3 y el intervalo dado de las unidades de referencia objetivo es entre aproximadamente $3,0 \times 10^5$ y $1,0 \times 10^6$, inclusive, si A es negativo para el marcador apoptótico (-) y CD8+CAR+ y B es TNF-alfa o un valor normalizado del mismo; es entre aproximadamente $3,75 \times 10^5$ y $1,25 \times 10^6$, inclusive, si A es CD8+CAR+ y B es TNF-alfa o un valor normalizado del mismo; es entre aproximadamente 4×10^5 y $2,0 \times 10^6$, inclusive, si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es IFN-gamma o un valor normalizado del mismo; es entre aproximadamente 5×10^6 y $2,5 \times 10^6$, inclusive, si A es CD8+CAR+ y B es IFN-gamma o un valor normalizado del mismo; es entre aproximadamente $2,0 \times 10^5$ y $3,0 \times 10^6$, inclusive, si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es IL-2 o un valor normalizado del mismo; es entre aproximadamente $2,5 \times 10^5$ y $3,75 \times 10^6$, inclusive, si A es CD8+CAR+ y B es IL-2 o un valor normalizado del mismo; es entre aproximadamente $3,0 \times 10^5$ y $1,5 \times 10^6$, inclusive, si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es TNF-alfa e IFN-gamma o un valor normalizado del mismo; es entre aproximadamente $3,75 \times 10^5$ y $1,88 \times 10^6$, inclusive, si A es CD8+CAR+ y B es TNF-alfa e IFN-gamma o un valor normalizado del mismo; es entre aproximadamente $3,0 \times 10^5$ y $2,5 \times 10^6$, inclusive, si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es TNF-alfa e IL-2 o un valor normalizado del mismo; es entre aproximadamente $3,75 \times 10^5$ y $3,2 \times 10^6$, inclusive, si A es CD8+CAR+ y B es TNF-alfa e IL-2 o un valor normalizado del mismo; es entre aproximadamente $4,0 \times 10^5$ y $3,0 \times 10^6$, inclusive, si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es IFN-gamma e IL-2 o un valor normalizado del mismo; es entre aproximadamente $5,0 \times 10^5$ y $3,75 \times 10^6$, inclusive, si A es CD8+CAR+ y B es IFN-gamma e IL-2 o un valor normalizado del mismo; es entre aproximadamente $4,0 \times 10^5$ y $2,0 \times 10^6$, inclusive, si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es TNF-alfa, IFN-gamma e IL-2 o un valor normalizado del mismo; es entre aproximadamente $5,0 \times 10^5$ y $2,5 \times 10^6$, inclusive, si A es CD8+CAR+ y B es TNF-alfa, IFN-gamma e IL-2 o un valor normalizado del mismo, opcionalmente donde el marcador de apoptosis es Anexina V o Caspasa 3 activa.

[0207] En algunas divulgaciones que pueden combinarse con cualquier otra divulgación del presente documento, el receptor recombinante es un CAR. En algunas divulgaciones, el CAR comprende un dominio de reconocimiento de antígeno extracelular que se une específicamente al antígeno y un dominio de señalización intracelular que comprende un ITAM, en el que opcionalmente, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio intracelular de una cadena CD3-zeta (CD3 ζ); y/o en el que el CAR comprende además una región de señalización costimuladora, que opcionalmente comprende un dominio de señalización de CD28 o 4-1BB. En algunas divulgaciones que pueden combinarse con cualquier otra divulgación, las células T son CD4+ o CD8+. En algunas divulgaciones, las células T son células T primarias, opcionalmente autólogas o alogénicas del sujeto.

IV. MÉTODOS DE TRATAMIENTO CON UNA CÉLULA T TERAPÉUTICA

COMPOSICIÓN

[0208] En el presente documento se describen métodos que implican administrar a un sujeto que tiene una enfermedad o afección una o más dosis unitarias de una composición terapéutica de células T. En algunas divulgaciones, la una o más dosis unitarias contienen un número de referencia objetivo de unidades de la composición celular basado en A (número de células de un fenotipo) y/o B (valor de un parámetro asociado con el grado de actividad dependiente del receptor recombinante, como la actividad dependiente de CAR, por ejemplo, actividad específica de antígeno).

A. Enfermedades y afecciones y métodos de administración

[0209] En algunas divulgaciones, se administra una dosis de células que expresan un receptor recombinante a un sujeto

para tratar o prevenir enfermedades, afecciones y trastornos, incluidos cánceres. En algunas divulgaciones, las células, poblaciones y composiciones se administran a un sujeto o paciente que padece la enfermedad o afección particular que se va a tratar, por ejemplo, mediante terapia celular adoptiva, como la terapia celular T adoptiva. En algunas divulgaciones, las células y las composiciones, como las composiciones de ingeniería y las composiciones al final de la producción tras la incubación y/u otros pasos de procesamiento, se administran a un sujeto, como un sujeto que padece o corre el riesgo de padecer la enfermedad o afección. En algunas divulgaciones, los métodos tratan de este modo, por ejemplo, mejoran uno o más síntomas de la enfermedad o afección, como por ejemplo disminuyendo la carga tumoral en un cáncer que expresa un antígeno reconocido por una célula T modificada.

[0210] Los métodos para la administración de células para terapia celular adoptiva son conocidos y pueden usarse en conexión con los métodos y composiciones divulgados. Por ejemplo, los métodos de terapia de células T adoptivas se describen, por ejemplo, en la publicación de solicitud de Patente de EE. UU. n.º 2003/0170238 a Gruenberg et al; Patente de EE. UU. n.º 4.690.915 a Rosenberg; Rosenberg (2011) Nat Rev Clin Oncol. 8(10):577-85). Véase, 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.

[0211] La enfermedad o afección que se trata puede ser cualquiera en la que la expresión de un antígeno esté asociada y/o implicada en la etiología de una afección o trastorno, por ejemplo, cause, exacerbe o esté implicada de otro modo en dicha enfermedad, afección o trastorno. Las enfermedades y afecciones ejemplares pueden incluir enfermedades o afecciones asociadas con malignidad o transformación de células (por ejemplo, cáncer), enfermedad autoinmune o inflamatoria, o una enfermedad infecciosa, por ejemplo, causada por un patógeno bacteriano, viral o de otro tipo. Los antígenos ejemplares, que incluyen antígenos asociados a diversas enfermedades y afecciones que pueden tratarse, se han descrito anteriormente. En determinadas divulgaciones, el receptor de antígeno quimérico o TCR transgénico se une específicamente a un antígeno asociado con la enfermedad o afección.

[0212] Entre las enfermedades, afecciones y trastornos se encuentran los tumores, incluidos los tumores sólidos, las neoplasias hematológicas y los melanomas, e incluidos los tumores localizados y metastásicos, las enfermedades infecciosas, como la infección por un virus u otro patógeno, por ejemplo, HIV, HCV, HBV, CMV, y las enfermedades parasitarias, y las enfermedades autoinmunes e inflamatorias. En algunas divulgaciones, la enfermedad o afección es un tumor, cáncer, malignidad, neoplasia u otra enfermedad o trastorno proliferativo. Dichas enfermedades incluyen, entre otras, la leucemia, el linfoma, p. ej, leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia linfoblástica aguda (ALL), linfoma no Hodgkin, leucemia mieloide aguda, mieloma múltiple, linfoma folicular refractario, linfoma de células del manto, linfoma indolente de células B, neoplasias malignas de células B, cánceres de colon, pulmón, hígado, mama, próstata, ovario, piel, melanoma, hueso y cerebro, cáncer de ovario, cánceres epiteliales, carcinoma de células renales, adenocarcinoma pancreático, linfoma de Hodgkin, carcinoma cervical, cáncer colorrectal, glioblastoma, neuroblastoma, sarcoma de Ewing, meduloblastoma, osteosarcoma, sarcoma sinovial y/o mesotelioma. En algunos casos, el sujeto padece leucemia linfoblástica aguda (ALL). En algunas divulgaciones, el sujeto tiene linfoma no Hodgkin.

[0213] En algunas divulgaciones, la enfermedad o condición es una enfermedad o condición infecciosa, tal como, pero no limitada a, infecciones virales, retrovirales, bacterianas y protozoarias, inmunodeficiencia, Citomegalovirus (CMV), virus de Epstein-Barr (EBV), adenovirus, poliomavirus BK. En algunas divulgaciones, la enfermedad o afección es una enfermedad o afección autoinmune o inflamatoria, como la artritis, por ejemplo, la artritis reumatoide (RA), la diabetes de tipo I, el lupus eritematoso sistémico (SLE), la enfermedad inflamatoria intestinal, la psoriasis, la esclerodermia, la enfermedad tiroidea autoinmune, la enfermedad de Grave, la enfermedad de Crohn, la esclerosis múltiple, el asma y/o una enfermedad o afección asociada a un trasplante.

[0214] En algunas divulgaciones, el antígeno asociado con la enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en receptor de tirosina quinasa huérfano ROR1, tEGFR, Her2, LI-CAM, CD19, CD20, CD22, mesotelina, CEA, y antígeno de superficie de hepatitis B, receptor antifolato, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, EGP-2, EGP-4, 0EPHa2, ErbB2, 3 o 4, FBP, receptor de acetilcolina fetal, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-alfa, IL-13R-alfa2, kdr, cadena ligera kappa, Lewis Y, molécula de adhesión celular L1, MAGE-A1, mesotelina, MUC1, MUC16, PSCA, ligandos NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, antígeno oncofetal, ROR1, TAG72, VEGF-R2, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno prostático específico, PSMA, Her2/neu, receptor de estrógenos, receptor de progesterona, efrinB2, CD123, CS-1, c-Met, GD-2, y MAGE A3, CE7, tumor de Wilms 1 (WT-1), una ciclina, como la ciclina A1 (CCNA1), y/o moléculas biotiniladas, y/o moléculas expresadas por HIV, HCV, HBV u otros patógenos.

[0215] En algunas divulgaciones, el antígeno es o incluye el integrina $\alpha\beta 6$ (integrina $\alpha\text{v}\beta 6$), el antígeno de maduración de células B (BCMA), B7-H3, B7-H6, la anhidrasa carbónica 9 (CA9, también conocida como CAIX o G250), un antígeno cancerígeno-testicular, antígeno cancerígeno/testicular 1B (CTAG, también conocido como NY-ESO-1 y LAGE-2), antígeno carcinoembrionario (CEA), una ciclina, ciclina A2, Líquido Quimiotáctico de Motivo C-C 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD138, CD171, proteína del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), proteína del factor de crecimiento epidérmico truncada (tEGFR), mutación del receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo III (EGFR VIII), glicoproteína epitelial 2 (EPG-2), glicoproteína epitelial 40 (EPG-40), efrinaB2, receptor de efrina A2 (EPHa2), receptor de estrógeno, receptor similar al receptor Fc 5 (FCRL5; también conocido como homólogo 5 del receptor Fc o FCRH5), receptor de acetilcolina fetal (AChR fetal), unión a folato (FBP), receptor de folato alfa, gangliósido GD2, GD2 O-acetilado (OGD2), gangliósido GD3, glicoproteína 100 (gp100), receptor

- acoplado a proteína G 5D (GPCR5D), Her2/neu (receptor tirosina quinasa erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), dímeros de erbB, antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular humano (HMW-MAA), antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, antígeno leucocitario humano A1 (HLA-A1), antígeno leucocitario humano A2 (HLA-A2), receptor alfa de IL-22 (IL-22Ra), IL-13 receptor alfa 2 (IL-13Ra2), receptor del dominio de inserción de quinasa (kdr), cadena ligera kappa, molécula de adhesión celular L1 (L1-CAM), epítipo CE7 de L1-CAM, miembro A de la familia 8 que contiene repeticiones ricas en leucina (LRRC8A), Lewis Y, antígeno asociado a melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, mesotelina, c-Met, citomegalovirus murino (CMV), mucina 1 (MUC1), MUC16, ligandos del receptor D del grupo 2 de células asesinas naturales (NKG2D), melan A (MART-1), molécula de adhesión de células nerviosas (NCAM), antígeno oncofetal, antígeno preferencialmente expresado en melanoma (PRAME), receptor de progesterona, un antígeno específico de próstata, antígeno de células madre de próstata (PSCA), antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), receptor tirosina quinasa similar a receptor huérfano 1 (ROR1), survivina, glicoproteína trofoblástica (TPBG también conocida como 5T4), glicoproteína asociada a tumores 72 (TAG72), receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2), tumor 1 de Wilms (WT-1), un antígeno específico de patógeno o un antígeno asociado con una marcación universal, y/o moléculas biotiniladas, y/o moléculas expresadas por HIV, HCV, HBV u otros patógenos. Los antígenos a los que se dirigen los receptores en algunas divulgaciones incluyen antígenos asociados con una neoplasia de células B, como cualquiera de una serie de marcadores de células B conocidos. En algunas divulgaciones, el antígeno es o incluye CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Igkappa, Iglambda, CD79a, CD79b o CD30.
- [0216]** En algunas divulgaciones, la terapia celular, por ejemplo, la terapia celular T adoptiva, se lleva a cabo mediante transferencia autóloga, en la que las células se aíslan y/o se preparan de otro modo a partir del sujeto que va a recibir la terapia celular, o a partir de una muestra derivada de dicho sujeto. Así, en algunas divulgaciones, las células se derivan de un sujeto, por ejemplo, un paciente, que necesita un tratamiento y las células, tras su aislamiento y procesamiento, se administran al mismo sujeto.
- [0217]** En algunas divulgaciones, la terapia celular, por ejemplo, la terapia celular T adoptiva, se lleva a cabo mediante transferencia alogénica, en la que las células se aíslan y/o se preparan de otro modo a partir de un sujeto distinto de un sujeto que va a recibir o que finalmente recibe la terapia celular, por ejemplo, un primer sujeto. En tales divulgaciones, las células se administran entonces a un sujeto diferente, por ejemplo, un segundo sujeto, de la misma especie. En algunas divulgaciones, el primer y el segundo sujeto son genéticamente idénticos. En algunas divulgaciones, el primer y el segundo sujeto son genéticamente similares. En algunas divulgaciones, el segundo sujeto expresa la misma clase o supertipo HLA que el primer sujeto.
- [0218]** Las células pueden administrarse por cualquier medio adecuado, por ejemplo, por infusión en bolo, por inyección, por ej, inyecciones intravenosas o subcutáneas, inyección intraocular, inyección periocular, inyección subretiniana, inyección intravítrea, inyección transeptal, inyección subescleral, inyección intracoroidea, inyección intracameral, inyección subconjuntival, inyección subtenoniana, inyección retrobulbar, inyección peribulbar o administración yuxtaescleral posterior. En algunas divulgaciones, se administran por vía parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para el tratamiento local, intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. En algunas divulgaciones, una dosis dada se administra mediante una única administración en bolo de las células. En algunas divulgaciones, se administra mediante múltiples administraciones en bolo de las células, por ejemplo, durante un periodo de no más de 3 días, o mediante la administración en infusión continua de las células.
- [0219]** Para la prevención o el tratamiento de enfermedades, la dosis adecuada puede depender del tipo de enfermedad a tratar, el tipo de células o receptores recombinantes, la gravedad y el curso de la enfermedad, si las células se administran con fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, la historia clínica del sujeto y la respuesta a las células, y la discreción del médico tratante. En algunas divulgaciones, las composiciones y las células se administran adecuadamente al sujeto de una sola vez o a lo largo de una serie de tratamientos.
- [0220]** En algunas divulgaciones, las células se administran como parte de un tratamiento combinado, tal como simultáneamente con o secuencialmente con, en cualquier orden, otra intervención terapéutica, tal como un anticuerpo o célula de ingeniería o receptor o agente, tal como un agente citotóxico o terapéutico. Las células en algunas divulgaciones se coadministran con uno o más agentes terapéuticos adicionales o en conexión con otra intervención terapéutica, ya sea simultánea o secuencialmente en cualquier orden. En algunos contextos, las células se coadministran con otra terapia lo suficientemente próxima en el tiempo como para que las poblaciones celulares potencien el efecto de uno o más agentes terapéuticos adicionales, o viceversa. En algunas divulgaciones, las células se administran antes de uno o más agentes terapéuticos adicionales. En algunas divulgaciones, las células se administran después de uno o más agentes terapéuticos adicionales. En algunas divulgaciones, el uno o más agentes adicionales incluyen una citoquina, como IL-2, por ejemplo, para mejorar la persistencia. En algunas divulgaciones, los métodos comprenden la administración de un agente quimioterapéutico.
- [0221]** En algunas divulgaciones, los métodos comprenden la administración de un agente quimioterapéutico, por ejemplo, un agente quimioterapéutico condicionante, para reducir la carga tumoral antes de la administración.
- [0222]** El preacondicionamiento de sujetos con terapias inmunodepletoras (por ejemplo, linfodepletoras) en algunas

divulgaciones puede mejorar los efectos de la terapia celular adoptiva (ACT).

[0223] Así, en algunas divulgaciones, los métodos incluyen la administración de un agente precondicionador, tal como un agente linfodepletor o quimioterapéutico, tal como ciclofosfamida, fludarabina, o combinaciones de los mismos, a un sujeto antes del inicio de la terapia celular. Por ejemplo, al sujeto se le puede administrar un agente precondicionador al menos 2 días antes, como al menos 3, 4, 5, 6 o 7 días antes, del inicio de la terapia celular. En algunas divulgaciones, al sujeto se le administra un agente precondicionador no más de 7 días antes, por ejemplo no más de 6, 5, 4, 3 o 2 días antes, del inicio de la terapia celular. En la solicitud de patente internacional n° WO2016/191756 se describen regímenes de dosificación de precondicionamiento ejemplares.

[0224] En algunas divulgaciones, el sujeto es precondicionado con ciclofosfamida a una dosis entre o entre aproximadamente 20 mg/kg y 120 mg/kg, tal como entre o entre aproximadamente 40 mg/kg y 80 mg/kg, cada uno inclusive. En algunas divulgaciones, el sujeto es precondicionado con o con aproximadamente 60 mg/kg de ciclofosfamida. En algunas divulgaciones, el sujeto se precondiciona con ciclofosfamida a una dosis entre o aproximadamente 200 mg/m² y 4440 mg/m², tal como entre o aproximadamente 200 mg/m² y 500 mg/m², cada uno inclusive. En algunos casos aquí descritos, el sujeto es precondicionado con 300 mg/m² de ciclofosfamida, en algunos casos diariamente, por ejemplo 300 mg/m²/día. En algunos casos divulgados aquí, el sujeto es precondicionado con o con aproximadamente 500 mg/m² de ciclofosfamida, en algunos casos diariamente por ejemplo 500 mg/m²/día. En algunos casos aquí descritos, el sujeto es precondicionado con o con aproximadamente 2220-4440 mg/m² de ciclofosfamida. En algunas divulgaciones, el sujeto se precondiciona con o con aproximadamente 200 mg/m²/día, aproximadamente 250 mg/m²/día, aproximadamente 300 mg/m²/día, aproximadamente 350 mg/m²/día, aproximadamente 400 mg/m²/día, aproximadamente 450 mg/m²/día, aproximadamente 500 mg/m²/día, aproximadamente 550 mg/m²/día, aproximadamente 600 mg/m²/día, aproximadamente 650 mg/m²/día, aproximadamente 700 mg/m²/día, aproximadamente 800 mg/m²/día, aproximadamente 900 mg/m²/día, o aproximadamente 1000 mg/m²/día. En algunas divulgaciones, la ciclofosfamida puede administrarse como una dosis única o puede administrarse como una pluralidad de dosis, como administradas diariamente, cada dos días o cada tres días. En algunas divulgaciones, la ciclofosfamida se administra una vez al día durante uno, dos, tres o más días. En algunas divulgaciones, las dosis aquí descritas representan dosis diarias, por ejemplo mg/m²/día, administradas diariamente durante tres días consecutivos.

[0225] En algunas divulgaciones, cuando el agente linfodepletor comprende fludarabina, el sujeto se administra fludarabina a una dosis entre o entre aproximadamente 1 mg/m² y 100 mg/m², tal como entre o entre aproximadamente 10 mg/m² y 75 mg/m², 15 mg/m² y 50 mg/m², 20 mg/m² y 30 mg/m², o 24 mg/m² y 26 mg/m², cada una inclusive. En algunos casos aquí divulgados, el sujeto se precondiciona con o con aproximadamente 10 mg/m²/día, aproximadamente 15 mg/m²/día, aproximadamente 20 mg/m²/día, aproximadamente 25 mg/m²/día, aproximadamente 30 mg/m²/día, aproximadamente 35 mg/m²/día, aproximadamente 40 mg/m²/día, aproximadamente 45 mg/m²/día, aproximadamente 50 mg/m²/día, aproximadamente 55 mg/m²/día, aproximadamente 60 mg/m²/día, aproximadamente 65 mg/m²/día, aproximadamente 70 mg/m²/día, aproximadamente 75 mg/m²/día, aproximadamente 80 mg/m²/día, aproximadamente 85 mg/m²/día, aproximadamente 90 mg/m²/día, aproximadamente 95 mg/m²/día, aproximadamente 100 mg/m²/día, aproximadamente 200 mg/m²/día, o aproximadamente 300 mg/m²/día. En algunos casos descritos en el presente documento, al sujeto se le administran 25 mg/m² de fludarabina. En algunos casos descritos en el presente documento, al sujeto se le administran 30 mg/m² de fludarabina. En algunas divulgaciones, la fludarabina puede administrarse en una dosis única o puede administrarse en una pluralidad de dosis, como administrarse diariamente, cada dos días o cada tres días. En algunas divulgaciones, la fludarabina se administra diariamente, por ejemplo, durante 1 a 5 días, por ejemplo, de 3 a 5 días. En algunas divulgaciones, las dosis aquí descritas representan dosis diarias, por ejemplo mg/m²/día, administradas diariamente durante tres días consecutivos.

[0226] En algunas divulgaciones, el agente linfodepletor comprende una combinación de agentes, como una combinación de ciclofosfamida y fludarabina. Así, la combinación de agentes puede incluir ciclofosfamida a cualquier dosis o pauta de administración, como las descritas anteriormente, y fludarabina a cualquier dosis o pauta de administración, como las descritas anteriormente. Por ejemplo, en algunas divulgaciones, al sujeto se le administran 60 mg/kg (~2 g/m²) de ciclofosfamida y de 3 a 5 dosis de 25 mg/m² de fludarabina antes de la primera dosis o de la siguiente. Administración

[0227] La composición farmacéutica en algunas divulgaciones contiene las células en cantidades eficaces para tratar o prevenir la enfermedad o afección, como una cantidad terapéuticamente eficaz o profilácticamente eficaz. En algunas divulgaciones, la composición incluye las células en una cantidad eficaz para reducir la carga de la enfermedad o afección.

[0228] En algunas divulgaciones, se divulgan métodos que implican administrar a un sujeto una o más dosis unitarias de una composición terapéutica de células T en la que cada dosis unitaria contiene (i) un número objetivo de células totales que expresan receptores recombinantes (p. ej., que expresan CAR) o un número objetivo o total de células que expresan receptores recombinantes (p. ej., que expresan CAR) de un determinado fenotipo; o (ii) un número objetivo de unidades de referencia (UCR) de la composición de células T que se encuentra dentro de un intervalo determinado u objetivo de UCR. En algunas divulgaciones, la dosis unitaria no contiene un número de unidades de referencia superior al umbral, como un número de unidades de referencia superior al de seguridad.

[0229] En algunas divulgaciones, se divulgan métodos de tratamiento que implican administrar a un sujeto que tiene una

enfermedad o afección una dosis unitaria de una composición de células T que comprende células que comprenden un receptor recombinante, tal como un receptor de antígeno quimérico (CAR), que se une específicamente a un antígeno asociado con la enfermedad o afección, en donde la dosis unitaria contiene un número objetivo de unidades de referencia (RU) dentro de un intervalo dado. Una RU en una composición dada se define mediante la fórmula $RU = A \times B$, en la que A es el número de células, o múltiplo, fracción o transformación del mismo, de un fenotipo presente en la composición dada o es la media o media ponderada del número de células, o múltiplo, fracción o transformación del mismo, de dos o más fenotipos en la composición dada; y B es el valor de un parámetro, o múltiplo o transformación del mismo, que indica o se correlaciona con el grado de actividad dependiente de un receptor recombinante, opcionalmente dependiente de CAR, en la composición dada. En el presente documento se describen atributos ejemplares asociados a A y B con referencia a la determinación o el suministro de una dosis unitaria de células para su administración.

[0230] En algunas divulgaciones, A es el número de células, o múltiplo o fracción o transformación de las mismas, de un fenotipo dado presente en la composición dada, tal como un fenotipo que es o incluye células CD8+ u otro fenotipo como se describe aquí. En algunas divulgaciones, A es la media o media ponderada del número de células, o múltiplo, fracción o transformación de las mismas, de dos o más fenotipos en la composición dada. En una divulgación, dos o más fenotipos comprenden un primer fenotipo que comprende CD8+ y un segundo fenotipo que comprende CD4+.

[0231] En algunas divulgaciones, el número objetivo de unidades contenidas en una dosis unitaria para administración que es menor que un número umbral de unidades de referencia, tal como un umbral predeterminado identificado o conocido para indicar un riesgo de un evento adverso, tal como toxicidad severa, tal como una toxicidad de grado 3 o superior o toxicidad de grado 4 o grado 5 al menos prolongada. En algunas divulgaciones, el número umbral de RU es un número de seguridad de unidades de referencia que puede determinarse a partir de un grupo o pluralidad de sujetos tratados de forma similar con una composición de células T terapéuticas, y típicamente una composición de células T terapéuticas producida, como por ingeniería, cultivada, activada, criopreservada, utilizando los mismos métodos o métodos similares. En algunas divulgaciones, la pluralidad de sujetos incluye al menos 10 sujetos, tales como al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90, al menos 100 o más sujetos.

[0232] En algunas divulgaciones, el número de unidades de referencia de seguridad es, con respecto a un grupo de sujetos analizados tras el tratamiento con una composición terapéutica de células T que comprende las células T que expresan el receptor recombinante, tal como un CAR, el número más bajo de unidades de referencia de la terapia administrada a un sujeto entre aquellos sujetos del grupo que pasaron a desarrollar un acontecimiento adverso. En algunas divulgaciones, el acontecimiento adverso es un acontecimiento adverso grave, opcionalmente neurotoxicidad grave, opcionalmente de grado 4 o superior o de grado 5 o neurotoxicidad de grado 3 al menos prolongada.

[0233] En algunas divulgaciones, el número objetivo de unidades de referencia es menor que el número de seguridad de unidades de referencia por una cantidad correspondiente a un factor de seguridad y/o por una cantidad dentro de un intervalo de 1,5 a 3 veces, opcionalmente aproximadamente 2 veces, o por una cantidad que es un múltiplo de una desviación estándar de un grupo de sujetos que no desarrollaron el evento adverso, opcionalmente neurotoxicidad de grado 0-2, opcionalmente donde el múltiplo está dentro de un intervalo de 1,5 a 3 veces.

[0234] En algunas divulgaciones, el número objetivo de unidades de referencia está en o por encima de un número de eficacia de referencia de unidades de referencia que puede determinarse a partir de un grupo o pluralidad de sujetos tratados de manera similar con una composición de células T terapéuticas, y típicamente una composición de células T terapéuticas producida, como por ingeniería, cultivada, cultivada, activada, criopreservada, usando los mismos métodos o métodos similares. En algunas divulgaciones, la pluralidad de sujetos incluye al menos 10 sujetos, tales como al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90, al menos 100 o más sujetos. En algunas divulgaciones, el número de unidades de referencia de eficacia es, con respecto a un grupo de sujetos analizados tras el tratamiento con una composición terapéutica de células T que comprende el receptor recombinante, opcionalmente el CAR, un número de unidades de la terapia administrada a uno o más sujetos entre el grupo que exhibieron un resultado terapéutico deseado, opcionalmente una respuesta parcial o una respuesta completa (CR).

[0235] En algunas divulgaciones, se divulgan métodos que implican administrar a un sujeto que tiene una enfermedad o afección una dosis unitaria de una composición de células T que comprende células que comprenden un receptor recombinante, tal como un receptor de antígeno quimérico (CAR), que se une específicamente a un antígeno asociado con la enfermedad o afección, en la que se administra un número objetivo de células totales CD8+ que expresan el receptor recombinante de la composición terapéutica y/o se administra una dosis unitaria de dichas células en la que se administra un número objetivo de unidades de referencia dentro de un intervalo dado, tal como se ha descrito anteriormente. En algunos casos, el número objetivo de unidades de referencia que se administra está en o por debajo de un número umbral de RU, de forma que la dosis unitaria no contiene más que el número umbral de RU. En algunas divulgaciones, el número objetivo de células receptoras recombinantes CD8+ totales que se administran son CD8+ que son marcadores apoptóticos negativos(-) y CD8+, opcionalmente en las que el marcador apoptótico es Anexina V o Caspasa 3 activa.

[0236] En algunas divulgaciones, los métodos divulgados implican administrar una dosis que contiene un número de

células, tal como una dosis que proporciona un número objetivo de células. En algunas divulgaciones, la dosis, como el número objetivo de células, está comprendida entre o entre aproximadamente 5.0×10^6 y 2.25×10^7 , 5.0×10^6 y 2.0×10^7 , 5.0×10^6 y 1.5×10^7 , 5.0×10^6 y 1.0×10^7 , 5.0×10^6 y 7.5×10^6 , 7.5×10^6 y 2.25×10^7 , 7.5×10^6 y 2.0×10^7 , 7.5×10^6 y 1.5×10^7 , 7.5×10^6 y 1.0×10^7 , 1.0×10^7 y 2.25×10^7 , 1.0×10^7 y 2.0×10^7 , 1.0×10^7 y 1.5×10^7 , 1.5×10^7 y 2.25×10^7 , 1.5×10^7 y 2.0×10^7 , 2.0×10^7 y 2.25×10^7 , cada uno inclusive. En algunas divulgaciones, tal dosis, tal como tal número objetivo de células se refiere al total de células que expresan receptores recombinantes en la composición administrada. En algunas divulgaciones, dicha dosis, como dicho número objetivo de células, se refiere al total de células que expresan receptores recombinantes que son CD8+ o que son marcadores apoptóticos negativos(-) y CD8+. En algunas divulgaciones, el marcador apoptótico es la anexina V o la caspasa 3 activa.

[0237] En algunas divulgaciones, la dosis de células de la dosis unitaria contiene un número de células, tal como un número objetivo de células, entre al menos o aproximadamente 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 10×10^6 y aproximadamente 15×10^6 células que expresan receptores recombinantes, tales como células que expresan receptores recombinantes que son CD8+ o que son marcadores apoptóticos negativos(-) y CD8+, opcionalmente en donde el marcador apoptótico es Anexina V o Caspasa 3 activa.

[0238] En algunas divulgaciones, la dosis de células de la dosis unitaria contiene un número de células, tal como un número objetivo de células, entre al menos o aproximadamente 5.55×10^6 , 6.66×10^6 , 7.77×10^6 , 8.99×10^6 , 1.0×10^7 , 1.1×10^7 y aproximadamente 1.67×10^7 células que expresan receptores recombinantes, opcionalmente células que expresan receptores recombinantes que son CD8+ o que son marcadores apoptóticos negativos(-) y CD8+, como cuando el marcador apoptótico es la anexina V o la caspasa 3 activa.

[0239] En algunas divulgaciones, la dosis de células de la dosis unitaria contiene un número de células, tal como un número objetivo de células, entre al menos o aproximadamente 6.25×10^6 , 7.5×10^6 , 8.75×10^6 , 1.0×10^7 , 1.13×10^7 , 1.25×10^7 y aproximadamente 1.9×10^7 células que expresan receptores recombinantes, opcionalmente células que expresan receptores recombinantes que son CD8+ o que son marcadores apoptóticos negativos(-) y CD8+, como cuando el marcador apoptótico es la anexina V o la caspasa 3 activa.

[0240] En algunas divulgaciones, la dosis de células de la dosis unitaria contiene un número de células, tal como un número objetivo de células, entre al menos o al menos aproximadamente entre al menos o al menos aproximadamente 7.14×10^6 , 8.5×10^6 , 1.0×10^7 , 1.14×10^7 , 1.29×10^7 , 1.42×10^7 y aproximadamente 2.14×10^7 células que expresan receptores recombinantes, opcionalmente células que expresan receptores recombinantes que son CD8+ o que son marcadores apoptóticos negativos(-) y CD8+, opcionalmente en las que el marcador apoptótico es la anexina V o la caspasa 3 activa.

[0241] En algunas divulgaciones, la dosis de células de la dosis unitaria contiene un número de células, tal como un número objetivo de células, entre al menos o aproximadamente 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 10×10^6 y aproximadamente 15×10^6 células que expresan receptores recombinantes que son marcador apoptótico negativo(-) y CD8+, opcionalmente en donde el marcador apoptótico es Anexina V o Caspasa 3 activa.

[0242] En algunas divulgaciones, la dosis de células de la dosis unitaria contiene un número de células, tal como un número objetivo de células, entre al menos o aproximadamente 6.25×10^6 , 7.5×10^6 , 8.75×10^6 , 1.0×10^7 , 1.13×10^7 , 1.25×10^7 y aproximadamente 1.9×10^7 células que expresan receptores recombinantes que son CD8+.

[0243] En algunas divulgaciones, el método incluye administrar a un sujeto que tiene una enfermedad o afección una dosis unitaria de una composición de células T que comprende células que comprenden un receptor recombinante, tal como un receptor de antígeno quimérico (CAR), que se une específicamente a un antígeno asociado con la enfermedad o afección, donde la dosis unitaria contiene un número objetivo de unidades de referencia (RU) dentro de un intervalo dado. En algunas divulgaciones, el número objetivo de unidades de referencia es menor que un valor umbral, tal como menor que un valor de seguridad de referencia. En algunas divulgaciones, el acontecimiento adverso es un acontecimiento adverso grave, como una neurotoxicidad grave de grado 4 o superior, o de grado 5, o una neurotoxicidad de grado 3 al menos prolongada. En algunas divulgaciones, el valor umbral es menor que el valor de seguridad de referencia en una cantidad correspondiente a un factor de seguridad o en al menos 2 veces.

[0244] En algunas divulgaciones, el evento adverso es neurotoxicidad de grado 4 o 5 y el valor umbral es aproximadamente 1.75×10^7 si A es negativo para el marcador apoptótico (-) y CD8+CAR+ y B es TNF-alfa o un valor normalizado de este; es aproximadamente 2.19×10^7 si A es CD8+CAR+ y B es TNF-alfa o un valor normalizado de este; es aproximadamente 1.25×10^7 si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es IFN-gamma o un valor normalizado de este; es aproximadamente 1.56×10^7 si A es CD8+CAR+ y B es IFN-gamma o un valor normalizado de este; es aproximadamente 1.5×10^7 si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es IL-2 o un valor normalizado de este; es aproximadamente 1.88×10^7 si A es CD8+CAR+ y B es IL-2 o un valor normalizado de este; es aproximadamente 1.5×10^7 si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es TNF-alfa e IFN-gamma o un valor normalizado de este; es aproximadamente 1.88×10^7 si A es CD8+CAR+ y B es TNF-alfa e IFN-gamma o un valor normalizado de este; es aproximadamente 2.0×10^7 si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es TNF-alfa e IL-2 o un valor normalizado de este; es aproximadamente 2.5×10^7 si A es CD8+CAR+ y B es TNF-alfa e IL-2 o un valor normalizado de este; es aproximadamente 1.25×10^7 si A es negativo para el marcador apoptótico

(-) CD8+CAR+ y si B es IFN-gamma e IL-2 o un valor normalizado de este; es aproximadamente $1,56 \times 10^7$ si A es CD8+CAR+ y B es IFN-gamma e IL-2 o un valor normalizado de este; es aproximadamente $1,75 \times 10^7$ si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es TNF-alfa, IFN-gamma e IL-2 o un valor normalizado de este; es aproximadamente $2,19 \times 10^7$ si A es CD8+CAR+ y B es TNF-alfa, IFN-gamma e IL-2 o un valor normalizado de este. En algunas divulgaciones, el marcador de apoptosis es la anexina V o la caspasa 3 activa.

[0245] En algunas divulgaciones, el evento adverso es neurotoxicidad de grado 4 o 5 y el intervalo dado de las unidades de referencia objetivo es entre aproximadamente $2,0 \times 10^5$ y $1,75 \times 10^7$, inclusive, si A es negativo para el marcador apoptótico (-) y CD8+CAR+ y B es TNF-alfa o un valor normalizado de este; es entre aproximadamente $2,5 \times 10^5$ y $2,19 \times 10^7$, inclusive, si A es CD8+CAR+ y B es TNF-alfa o un valor normalizado de este; es entre aproximadamente 4×10^5 y $1,25 \times 10^7$, inclusive, si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es IFN-gamma o un valor normalizado de este; es entre aproximadamente 5×10^5 y $1,56 \times 10^7$, inclusive, si A es CD8+CAR+ y B es IFN-gamma o un valor normalizado de este; es entre aproximadamente $2,0 \times 10^5$ y $1,5 \times 10^7$, inclusive, si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es IL-2 o un valor normalizado de este; es entre aproximadamente $2,5 \times 10^5$ y $1,88 \times 10^7$, inclusive, si A es CD8+CAR+ y B es IL-2 o un valor normalizado de este; es entre aproximadamente $3,0 \times 10^5$ y $1,5 \times 10^7$, inclusive, si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es TNF-alfa e IFN-gamma o un valor normalizado de este; es entre aproximadamente $3,75 \times 10^5$ y $1,88 \times 10^7$, inclusive, si A es CD8+CAR+ y B es TNF-alfa e IFN-gamma o un valor normalizado de este; es entre aproximadamente $3,0 \times 10^5$ y $2,0 \times 10^7$, inclusive, si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es TNF-alfa e IL-2 o un valor normalizado de este; es entre aproximadamente $3,75 \times 10^5$ y $2,5 \times 10^7$, inclusive, si A es CD8+CAR+ y B es TNF-alfa e IL-2 o un valor normalizado de este; es entre aproximadamente $4,0 \times 10^5$ y $1,25 \times 10^7$, inclusive, si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es IFN-gamma e IL-2 o un valor normalizado de este; es entre aproximadamente $5,0 \times 10^5$ y $1,56 \times 10^7$, inclusive, si A es CD8+CAR+ y si B es IFN-gamma e IL-2 o un valor normalizado de este; es entre aproximadamente $4,0 \times 10^5$ y $1,75 \times 10^7$, inclusive, si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es TNF-alfa, IFN-gamma e IL-2 o un valor normalizado de este; es entre aproximadamente $5,0 \times 10^5$ y $2,19 \times 10^7$, inclusive, si A es CD8+CAR+ y B es TNF-alfa, IFN-gamma e IL-2 o un valor normalizado de este. En algunas divulgaciones, el marcador de apoptosis es la anexina V o la caspasa 3 activa.

[0246] En algunas revelaciones, el evento adverso es al menos una neurotoxicidad prolongada de grado 3 y el valor umbral es aproximadamente: es o aproximadamente $1,0 \times 10^6$ si A es negativo para el marcador apoptótico (-) y CD8+CAR+ y B es TNF-alfa o un valor normalizado de este; es o aproximadamente $1,25 \times 10^6$ si A es CD8+CAR+ y B es TNF-alfa o un valor normalizado de este; es o aproximadamente $2,0 \times 10^6$ si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es IFN-gamma o un valor normalizado de este; es o aproximadamente $2,5 \times 10^6$ si A es CD8+CAR+ y B es IFN-gamma o un valor normalizado de este; es o aproximadamente $3,0 \times 10^6$ si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es IL-2 o un valor normalizado de este; es o aproximadamente $3,75 \times 10^6$ si A es CD8+CAR+ y B es IL-2 o un valor normalizado de este; es o aproximadamente $1,5 \times 10^6$ si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es TNF-alfa e IFN-gamma o un valor normalizado de este; es o aproximadamente $1,88 \times 10^6$ si A es CD8+CAR+ y B es TNF-alfa e IFN-gamma o un valor normalizado de este; es o aproximadamente $2,5 \times 10^6$ si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es TNF-alfa e IL-2 o un valor normalizado de este; es o aproximadamente $3,12 \times 10^6$ si A es CD8+CAR+ y B es TNF-alfa e IL-2; o un valor normalizado de este es o aproximadamente $3,0 \times 10^6$ si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es IFN-gamma e IL-2 o un valor normalizado de este; es o aproximadamente $3,75 \times 10^6$ si A es CD8+CAR+ y B es IFN-gamma e IL-2 o un valor normalizado de este; es o aproximadamente $2,0 \times 10^6$ si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es TNF-alfa, IFN-gamma e IL-2 o un valor normalizado de este; es o aproximadamente $2,5 \times 10^6$ si A es CD8+CAR+ y B es TNF-alfa, IFN-gamma e IL-2 o un valor normalizado de este. En algunas divulgaciones, el marcador de apoptosis es la anexina V o la caspasa 3 activa.

[0247] En algunas divulgaciones, el evento adverso es al menos de grado 3 prolongado y el intervalo dado de las unidades de referencia objetivo es entre aproximadamente $3,0 \times 10^5$ y $1,0 \times 10^6$, inclusive, si A es negativo para el marcador apoptótico (-) y CD8+CAR+ y B es TNF-alfa o un valor normalizado de este; es entre aproximadamente $3,75 \times 10^5$ y $1,25 \times 10^6$, inclusive, si A es CD8+CAR+ y B es TNF-alfa o un valor normalizado de este; es entre aproximadamente 4×10^5 y $2,0 \times 10^6$, inclusive, si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es IFN-gamma o un valor normalizado de este; es entre aproximadamente 5×10^5 y $2,5 \times 10^6$, inclusive, si A es CD8+CAR+ y B es IFN-gamma o un valor normalizado de este; es entre aproximadamente $2,0 \times 10^5$ y $3,0 \times 10^6$, inclusive, si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es IL-2 o un valor normalizado de este; es entre aproximadamente $2,5 \times 10^5$ y $3,75 \times 10^6$, inclusive, si A es CD8+CAR+ y B es IL-2 o un valor normalizado de este; es entre aproximadamente $3,0 \times 10^5$ y $1,5 \times 10^6$, inclusive, si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es TNF-alfa e IFN-gamma o un valor normalizado de este; es entre aproximadamente $3,75 \times 10^5$ y $1,88 \times 10^6$, inclusive, si A es CD8+CAR+ y B es TNF-alfa e IFN-gamma o un valor normalizado de este; es entre aproximadamente $3,0 \times 10^5$ y $2,5 \times 10^6$, inclusive, si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es TNF-alfa e IL-2 o un valor normalizado de este; es entre aproximadamente $3,75 \times 10^5$ y $3,12 \times 10^6$, inclusive, si A es CD8+CAR+ y B es TNF-alfa e IL-2 o un valor normalizado de este; es entre aproximadamente $4,0 \times 10^5$ y $3,0 \times 10^6$, inclusive, si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es IFN-gamma e IL-2 o un valor normalizado de este; es entre aproximadamente $5,0 \times 10^5$ y $3,75 \times 10^6$, inclusive, si A es CD8+CAR+ y B es IFN-gamma e IL-2 o un valor normalizado de este; es entre aproximadamente $4,0 \times 10^5$ y $2,0 \times 10^6$, inclusive, si A es negativo para el marcador apoptótico (-) CD8+CAR+ y si B es TNF-alfa, IFN-gamma e IL-2 o un valor normalizado de este; es entre aproximadamente $5,0 \times 10^5$ y $2,5 \times 10^6$, inclusive, si A es

CD8+CAR+ y B es TNF-alfa, IFN-gamma e IL-2 o un valor normalizado de este. En algunas divulgaciones, el marcador de apoptosis es la anexina V o la caspasa 3 activa.

[0248] En ciertas divulgaciones, las células, o poblaciones individuales de subtipos de células, se administran al sujeto en un intervalo de aproximadamente un millón a aproximadamente 100 mil millones de células y/o esa cantidad de células por kilogramo de peso corporal, tal como, por ejemplo, de 1 millón a aproximadamente 50 mil 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 de los valores anteriores), como por ejemplo, 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 de los valores anteriores), y en algunos casos entre aproximadamente 100 millones de células y 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 y/o por kilogramo de peso corporal. Las dosis pueden variar en función de los atributos propios de la enfermedad o trastorno y/o del paciente y/o de otros tratamientos.

[0249] En algunas divulgaciones, por ejemplo, cuando el sujeto es un humano, la dosis incluye menos de aproximadamente 5×10^8 células totales que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR), células T o células mononucleares de sangre periférica (PBMC), por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 1×10^6 a 5×10^8 células de este tipo, como 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , o 5×10^8 células de este tipo totales, o el intervalo entre dos de los valores anteriores.

[0250] En algunas divulgaciones, la dosis de células modificadas genéticamente comprende desde o aproximadamente 1×10^5 to 5×10^8 células T totales que expresan CAR, 1×10^5 to $2,5 \times 10^8$ células T totales que expresan CAR, 1×10^5 to 1×10^8 células T totales que expresan CAR, 1×10^5 to 5×10^7 células T totales que expresan CAR, 1×10^5 to $2,5 \times 10^7$ células T totales que expresan CAR, 1×10^5 to 1×10^7 células T totales que expresan CAR, 1×10^5 to 5×10^6 células T totales que expresan CAR, 1×10^5 to $2,5 \times 10^6$ células T totales que expresan CAR, 1×10^5 to 1×10^6 células T totales que expresan CAR, 1×10^6 to 5×10^8 células T totales que expresan CAR, 1×10^6 to $2,5 \times 10^8$ células T totales que expresan CAR, 1×10^6 to 1×10^8 células T totales que expresan CAR, 1×10^6 to 5×10^7 células T totales que expresan CAR, 1×10^6 to $2,5 \times 10^7$ células T totales que expresan CAR, 1×10^6 to 1×10^7 células T totales que expresan CAR, 1×10^6 to 5×10^6 células T totales que expresan CAR, 1×10^6 to $2,5 \times 10^6$ células T totales que expresan CAR, $2,5 \times 10^6$ to 5×10^8 células T totales que expresan CAR, $2,5 \times 10^6$ to $2,5 \times 10^8$ células T totales que expresan CAR, $2,5 \times 10^6$ to 1×10^8 células T totales que expresan CAR, $2,5 \times 10^6$ to 5×10^7 células T totales que expresan CAR, $2,5 \times 10^6$ to $2,5 \times 10^6$ células T totales que expresan CAR, $2,5 \times 10^6$ to 1×10^7 células T totales que expresan CAR, $2,5 \times 10^6$ to 5×10^6 células T totales que expresan CAR, 5×10^6 to 5×10^8 células T totales que expresan CAR, 5×10^6 to $2,5 \times 10^8$ células T totales que expresan CAR, 5×10^6 to 1×10^8 células T totales que expresan CAR, 5×10^6 to 5×10^7 células T totales que expresan CAR, 5×10^6 to $2,5 \times 10^7$ células T totales que expresan CAR, 5×10^6 to 1×10^7 células T totales que expresan CAR, 1×10^7 to 5×10^8 células T totales que expresan CAR, 1×10^7 to $2,5 \times 10^8$ células T totales que expresan CAR, 1×10^7 to 1×10^8 células T totales que expresan CAR, 1×10^7 to 5×10^7 células T totales que expresan CAR, 1×10^7 to $2,5 \times 10^7$ células T totales que expresan CAR, $2,5 \times 10^7$ to 5×10^8 células T totales que expresan CAR, $2,5 \times 10^7$ to $2,5 \times 10^8$ células T totales que expresan CAR, $2,5 \times 10^7$ to 1×10^8 células T totales que expresan CAR, $2,5 \times 10^7$ to 5×10^7 células T totales que expresan CAR, 5×10^7 to 5×10^8 células T totales que expresan CAR, 5×10^7 to $2,5 \times 10^8$ células T totales que expresan CAR, 5×10^7 to 1×10^8 células T totales que expresan CAR, 1×10^8 to 5×10^8 células T totales que expresan CAR, 1×10^8 to $2,5 \times 10^8$ células T totales que expresan CAR, o $2,5 \times 10^8$ to 5×10^8 células T totales que expresan CAR.

[0251] En algunas divulgaciones, la dosis de células modificadas genéticamente comprende al menos o al menos aproximadamente 1×10^5 células que expresan CAR, al menos o al menos aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células que expresan CAR, al menos o al menos aproximadamente 5×10^5 células que expresan CAR, al menos o al menos aproximadamente 1×10^6 células que expresan CAR, al menos o al menos aproximadamente 25×10^6 células con expresión de CAR, al menos o aproximadamente 5×10^6 células con expresión de CAR, al menos o aproximadamente 1×10^7 células con expresión de CAR, al menos o aproximadamente $2,5 \times 10^7$ células con expresión de CAR, al menos o aproximadamente 5×10^7 células con expresión de CAR, al menos o aproximadamente 1×10^8 células con expresión de CAR, al menos o aproximadamente $2,5 \times 10^8$ células con expresión de CAR, o al menos o aproximadamente 5×10^8 células con expresión de CAR.

[0252] En algunas divulgaciones, la terapia celular comprende la administración de una dosis que comprende un número de células de o de aproximadamente 1×10^5 a 5×10^5 células totales que expresan receptores recombinantes, células T

- totales o células mononucleares de sangre periférica (PBMC) totales, desde o desde aproximadamente 5×10^5 a 1×10^7 células totales expresantes de receptores recombinantes, células T totales o células mononucleares de sangre periférica (PBMC) totales o desde o desde aproximadamente 1×10^6 a 1×10^7 células totales expresantes de receptores recombinantes, células T totales o células mononucleares de sangre periférica (PBMC) totales, cada una inclusive. En algunas divulgaciones, la terapia celular comprende la administración de una dosis de células que comprende un número de células de al menos o aproximadamente al menos 1×10^5 células totales que expresan receptores recombinantes, células T totales o células mononucleares de sangre periférica (PBMC) totales, tales como al menos o aproximadamente al menos 1×10^6 , al menos o aproximadamente al menos 1×10^7 , al menos o aproximadamente al menos 1×10^8 de tales células. En algunas divulgaciones, el número se refiere al número total de células CD3+ o CD8+, en algunos casos también células que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR+). En algunas divulgaciones, la terapia celular comprende la administración de una dosis que comprende un número de células de o de aproximadamente 1×10^5 a 5×10^8 células T totales CD3+ o CD8+ o células CD3+ o CD8+ que expresan receptores recombinantes, de o de aproximadamente 5×10^5 a 1×10^7 células T totales CD3+ o CD8+ o células CD3+ o CD8+ que expresan receptores recombinantes, o de o de aproximadamente 1×10^6 a 1×10^7 células T totales CD3+ o CD8+ o células CD3+ o CD8+ que expresan receptores recombinantes, cada una inclusive. En algunas divulgaciones, la terapia celular comprende la administración de una dosis que comprende un número de células de o de aproximadamente 1×10^5 a 5×10^8 células CD3+/CAR+ o CD8+/CAR+ totales, de o de aproximadamente 5×10^5 a 1×10^7 células CD3+/CAR+ o CD8+/CAR+ totales, o de o de aproximadamente 1×10^6 a 1×10^7 células CD3+/CAR+ o CD8+/CAR+ totales, cada una inclusive.
- [0253]** En algunas divulgaciones, las células T de la dosis incluyen células T CD4+, células T CD8+ o células T CD4+ y CD8+.
- [0254]** En algunas divulgaciones, por ejemplo, cuando el sujeto es humano, las células T CD8+ de la dosis, incluyendo en una dosis que incluye células T CD4+ y CD8+, incluye entre aproximadamente 1×10^6 y 5×10^8 células totales de receptor recombinante (por ej. células CD8+ que expresan CAR, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 5×10^6 a 1×10^8 células, tales células 1×10^7 , $2,5 \times 10^7$, 5×10^7 , $7,5 \times 10^7$, 1×10^8 o 5×10^8 células totales, o el intervalo entre dos de los valores anteriores. En algunas divulgaciones, al paciente se le administran múltiples dosis, y cada una de las dosis o la dosis total puede estar dentro de cualquiera de los valores anteriores. En algunas divulgaciones, la dosis de células comprende la administración de 1×10^7 a $0,75 \times 10^8$ células T CD8+ que expresan receptores recombinantes, de 1×10^7 a $2,5 \times 10^7$ células T CD8+ que expresan receptores recombinantes, de 1×10^7 a $0,75 \times 10^8$ células T CD8+ que expresan receptores recombinantes, cada una inclusive. En algunas divulgaciones, la dosis de células comprende la administración de o aproximadamente 1×10^6 , $2,5 \times 10^7$, 5×10^7 , $7,5 \times 10^7$, 1×10^8 , o 5×10^8 células T CD8+ totales que expresan receptores recombinantes.
- [0255]** En algunas divulgaciones, la dosis de células, por ejemplo, células T recombinantes que expresan receptores, se administra al sujeto como dosis única o se administra una sola vez en un periodo de dos semanas, un mes, tres meses, seis meses, 1 año o más.
- [0256]** En el contexto de la terapia celular adoptiva, la administración de una "dosis" dada abarca la administración de la cantidad o número dado de células como una composición única y/o administración única ininterrumpida, por ejemplo, como una inyección única o infusión continua, y también abarca la administración de la cantidad o número dado de células como una dosis dividida, proporcionada en múltiples composiciones o infusiones individuales, durante un periodo de tiempo especificado, que no es más de 3 días. Así, en algunos contextos, la dosis es una administración única o continua del número especificado de células, administrada o iniciada en un único momento. En algunos contextos, sin embargo, la dosis se administra en múltiples inyecciones o infusiones durante un periodo no superior a tres días, como una vez al día durante tres días o durante dos días o mediante múltiples infusiones durante un periodo de un solo día.
- [0257]** Así, en algunas divulgaciones, las células de la dosis se administran en una única composición farmacéutica. En algunas divulgaciones, las células de la dosis se administran en una pluralidad de composiciones, que contienen colectivamente las células de la primera dosis.
- [0258]** El término "dosis dividida" se refiere a una dosis que se divide para que se administre en más de un día. Este tipo de dosificación se incluye en los presentes métodos y se considera una dosis única.
- [0259]** Por lo tanto, la dosis en algunas divulgaciones puede administrarse como una dosis dividida. Por ejemplo, en algunas divulgaciones, la dosis puede administrarse al sujeto durante 2 días o durante 3 días. Los métodos ejemplares para la dosificación dividida incluyen la administración del 25% de la dosis el primer día y la administración del 75% restante de la dosis el segundo día. En otras divulgaciones, el 33% de la primera dosis puede administrarse el primer día y el 67% restante el segundo día. En algunas divulgaciones, el 10% de la dosis se administra el primer día, el 30% de la dosis se administra el segundo día y el 60% de la dosis se administra el tercer día. En algunas divulgaciones, la dosis dividida no se extiende durante más de 3 días.
- [0260]** En algunas divulgaciones, las células se administran a una dosis deseada, que en algunas divulgaciones incluye una dosis o número deseado de células o tipo(s) celular(es) y/o una proporción deseada de tipos celulares. Así, la dosificación de células en algunas divulgaciones se basa en un número objetivo de células totales o un número objetivo de referencia de unidades y una proporción deseada de las poblaciones o subtipos individuales, como la proporción de

CD4+ a CD8+. En algunas divulgaciones, la dosificación de células se basa en un número objetivo deseado de células totales o en un número objetivo de referencia de unidades en las poblaciones individuales o de tipos celulares individuales. En algunas divulgaciones, la dosificación se basa en una combinación de tales características, como un número deseado de células totales, unidades de referencia objetivo, relación deseada y número total deseado de células en las poblaciones individuales.

[0261] En algunas divulgaciones, las poblaciones o subtipos de células, como las células T CD8+ y CD4+, se administran a una diferencia tolerada de una dosis deseada de células totales, como una dosis deseada de células T, o dentro de ella. En algunas divulgaciones, 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 administran las células, por ejemplo, células/kg. En algunas divulgaciones, la dosis deseada es igual o superior a un número mínimo de células o a un número mínimo de células por unidad de peso corporal. En algunas divulgaciones, entre las células totales, administradas a la dosis deseada, las poblaciones o subtipos individuales están presentes en o cerca de una proporción de salida deseada (como la proporción de CD4+ a CD8+), por ejemplo, dentro de una cierta diferencia o error tolerado de dicha proporción.

[0262] En algunas divulgaciones, las células se administran en o dentro de una diferencia tolerada de una dosis deseada de una o más de las poblaciones individuales o subtipos de células, como una dosis deseada de células CD4+ y/o una dosis deseada de células CD8+. En algunas divulgaciones, 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 administran las células, por ejemplo, células/kg. En algunas divulgaciones, la dosis deseada es igual o superior a un número mínimo de células de la población o subtipo, o número mínimo de células de la población o subtipo por unidad de peso corporal.

[0263] Así, en algunas divulgaciones, la dosificación se basa en una dosis fija deseada de células totales y una proporción deseada, y/o se basa en una dosis fija deseada de uno o más, *por ej.*, cada uno, de los subtipos o subpoblaciones individuales. Así, en algunas divulgaciones, la dosificación se basa en una dosis fija deseada, que puede ser igual o superior a una dosis mínima de células T y/o igual o superior a una dosis máxima, y en algunas divulgaciones una proporción deseada de células CD4+ a CD8+, y/o se basa en una dosis fija deseada de células CD4+ y/o CD8+.

[0264] En algunas divulgaciones, la dosis o dosis objetivo incluye en o aproximadamente o es menor que en o aproximadamente 5×10^6 células CD8+CAR+, incluye en o aproximadamente o es menor que en o aproximadamente 7×10^6 células CD8+ CAR+ o células CD3+CAR+, incluye en o aproximadamente o es menor que en o aproximadamente 8×10^6 células CD8+ CAR+ o células CD3+CAR+, incluya o aproximadamente o sea inferior a 8×10^6 células CD8+ CAR+ o CD3+CAR+, incluya o aproximadamente o sea inferior a 9×10^6 células CD8+ CAR+ o CD3+CAR+, incluya o aproximadamente o sea inferior a 10×10^6 células CD8+ CAR+, incluye en o aproximadamente o es inferior a en o aproximadamente 11×10^6 células CD8+ CAR+ o CD3+CAR+, incluye en o aproximadamente o es inferior a en o aproximadamente 12×10^6 células CD8+ CAR+, incluye en o aproximadamente o es inferior a en o aproximadamente 13×10^6 células CD8+ CAR+ o CD3+CAR+, incluye o aproximadamente o es inferior a 14×10^6 células CD8+ CAR+, incluye o aproximadamente o es inferior a 15×10^6 células CD8+ CAR+ o células CD3+CAR+, incluye o aproximadamente o es inferior a 20×10^6 o 30×10^6 o 40×10^6 o 50×10^6 células CD8+ CAR+ o células CD3+CAR+. En algunas divulgaciones, al menos al 70, 75, 80, 85 o 90 % de las células CD8+CAR+ de dicha dosis presentan una o más propiedades o fenotipos indicativos de salud celular o de célula CAR biológicamente activa, como la ausencia de un marcador apoptótico, y/o el proceso utilizado para producir las células consigue un porcentaje de dichas células entre las células CD8+CAR+ de la dosis dentro del 70-90 % o en una media del 80 % del tiempo. En algunas divulgaciones, la varianza de la frecuencia de células biológicamente activas o funcionales o no apoptóticas entre la dosis es inferior a un valor umbral, y/o la frecuencia no varía fuera del intervalo del 70-80% más del 1, 5, 10 o 20% del tiempo.

[0265] En algunas divulgaciones, las células se administran en o dentro de un intervalo tolerado de una proporción de salida deseada de múltiples poblaciones o subtipos celulares, tales como células o subtipos CD4+ y CD8+. En algunas divulgaciones, la proporción deseada puede ser una proporción específica o puede ser un intervalo de proporciones. Por ejemplo, en algunas divulgaciones, la proporción deseada (por ejemplo, la proporción de células CD4+ a células CD8+) está entre aproximadamente 5:1 y aproximadamente 1:5 (o mayor que aproximadamente 1:5 y menor que aproximadamente 5:1), o entre aproximadamente 1:3 y aproximadamente 3:1 (o mayor que aproximadamente 1:3 y menor que aproximadamente 3:1), como entre aproximadamente 2:1 y aproximadamente 1:5 (o mayor que aproximadamente 1:5 y menor que aproximadamente 2:1, incluyendo cada extremo), o como aproximadamente 5:1, 4.5:1, 4:1, 3.5:1, 3:1, 2.5:1, 2:1, 1.9:1, 1.8:1, 1.7:1, 1.6:1, 1.5:1, 1.4:1, 1.3:1, 1.2:1, 1.1:1, 1:1, 1:1.1, 1:1.2, 1:1.3, 1:1.4, 1:1.5, 1:1.6, 1:1.7, 1:1.8, 1:1.9, 1:2, 1:2.5, 1:3, 1:3.5, 1:4, 1:4.5, o 1:5. En algunas divulgaciones, 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.

B. Factores clínicos y/o del paciente

[0266] En algunos de los casos aquí descritos, una dosis de células de acuerdo con los métodos aquí descritos puede administrarse a un sujeto con un factor de riesgo clínico y/o específico del paciente como cualquiera de los aquí descritos. En algunas divulgaciones, entre dichos sujetos tratados, el método no produce ninguna diferencia sustancial, ninguna

diferencia significativa, o ninguna diferencia por encima de un nivel o grado umbral, en la incidencia o riesgo de una toxicidad, por ejemplo, efecto secundario adverso grave, CRS, y/o neurotoxicidad o grado de la misma, en comparación con el grupo total de sujetos tratados según el método o sujetos que no tienen dicho factor de riesgo clínico o específico del paciente. En ciertas divulgaciones, la diferencia para los sujetos que tienen dicho factor de riesgo en comparación con el número total de sujetos o sujetos sin el factor de riesgo no es superior al 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% o 30%, 35% o 40%. En algunas divulgaciones, la toxicidad es CRS. En determinadas divulgaciones, la toxicidad es CRS de grado 2 o superior, de grado 3 o superior, de grado 4 o superior, o de grado 5. En ciertas divulgaciones, la toxicidad es neurotoxicidad. En determinadas divulgaciones, la toxicidad es neurotoxicidad de grado 2 o superior, de grado 3 o superior, de grado 4 o superior, o de grado 5. En algunas divulgaciones, la toxicidad es o está asociada con edema cerebral.

[0267] En ciertas divulgaciones, una dosis de células de acuerdo con los métodos aquí divulgados se administra a un sujeto sin un paciente y/o factor clínico, tal como cualquiera descrito aquí. En algunas divulgaciones, se administra una dosis reducida y/o menor de células a un sujeto con un paciente y/o factor clínico. En ciertas divulgaciones, la dosis reducida y/o inferior es o es al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% menor que la dosis que se administra a un sujeto sin un paciente y/o factor clínico. En ciertas divulgaciones, no hay diferencia sustancial en la incidencia de toxicidad, por ejemplo, efecto secundario adverso grave, CRS, y/o neurotoxicidad, entre los sujetos sin un paciente y/o factor clínico a los que se administra la dosis de células y los sujetos con un paciente y/o factor clínico a los que se administra la dosis más baja de células.

[0268] En algunas divulgaciones, el paciente y/o factor clínico es una cantidad de terapias previas, por ejemplo, una o más terapias antes de la iniciación de la administración de la composición de células T terapéuticas. En algunas divulgaciones, las terapias anteriores se han administrado para tratar la misma enfermedad y/o afección que la composición de células T terapéuticas. En divulgaciones particulares, el paciente y/o factor clínico es menos de diez terapias previas, nueve terapias previas, ocho terapias previas, siete terapias previas, seis terapias previas, cinco terapias previas, cuatro terapias previas, tres terapias previas, dos terapias previas, o menos de una terapia previa. En algunas divulgaciones, el paciente y/o el factor clínico son menos de tres terapias previas. En ciertas divulgaciones, el paciente y/o el factor clínico son dos o menos terapias previas.

[0269] En ciertas divulgaciones, el paciente y/o factor clínico es la edad, por ejemplo, la edad del sujeto al inicio de la administración de la composición de células T terapéuticas. En ciertas divulgaciones, el paciente y/o factor clínico es un joven y/o una edad relativamente joven. En algunas divulgaciones, el paciente y/o factor clínico tiene una edad inferior a 65 años, 60 años, 55 años, 50 años, 45 años, 40 años, 35 años, 30 años, 25 años o 20 años. En determinadas divulgaciones, el paciente y/o el factor clínico es una edad inferior a 30 años.

[0270] En divulgaciones particulares, el paciente y/o factor clínico es la proporción de células T CD4:CD8 en una muestra de aféresis del sujeto. En algunas divulgaciones, el paciente y/o el factor clínico es la proporción de células T CD4:CD8 en una muestra de aféresis por debajo de un determinado umbral. En ciertas divulgaciones, el paciente y/o factor clínico es una proporción de células T CD4:CD8 inferior a 3:1, 2:1, 1,5:1, 1:1, 0,9:1, 0,8:1, 0,7:1, 0,6:1, 0,5:1, 0,4:1, 0,3:1, 0,2:1 o 0,1:1. En ciertas divulgaciones, la proporción de células T CD4:CD8 en una muestra de aféresis es un factor clínico y/o del paciente cuando la dosis administrada se basa en las células T totales o en las células T totales que expresan un receptor recombinante. En determinadas divulgaciones, el factor clínico y/o del paciente es la proporción de células T CD4:CD8 en una muestra de aféresis inferior a 1:5, inferior a 1:1 o inferior a 0,5:1.

[0271] En ciertas divulgaciones, el paciente y/o factor clínico es el peso del sujeto, por ejemplo, el peso corporal. En ciertas divulgaciones, el peso del sujeto es el peso del sujeto en el momento en que se administra la composición de células T terapéuticas. En ciertas divulgaciones, el paciente y/o el factor clínico es el peso por encima de 100 lb, por encima de 125 lb, por encima de 150 lb, por encima de 175 lb, por encima de 200 lb, por encima de 225 lb, por encima de 250 lb, por encima de 275 lb, por encima de 300 lb, por encima de 350 lb o por encima de 400 lb. En determinadas divulgaciones, el paciente y/o el factor clínico es un peso superior a 50 kg, 60 kg, 70 kg, 80 kg, 90 kg, 100 kg, 125 kg, 150 kg, 175 kg o 200 kg. En algunas divulgaciones, el paciente y/o factor clínico es un peso superior al peso medio entre un grupo de sujetos. En determinadas divulgaciones, el factor clínico y/o del paciente es un peso superior a la media, mediana y/o moda entre un grupo de sujetos. En algunas divulgaciones, el grupo de sujetos se trata con la misma composición celular terapéutica.

[0272] En ciertas divulgaciones, el paciente y/o factor clínico es el recuento de plaquetas. En algunas divulgaciones, el paciente y/o el factor clínico es un recuento de plaquetas de o aproximadamente inferior a 500.000, inferior a 450.000, inferior a 400.000, inferior a 350.000, inferior a 300.000, inferior a 250.000, inferior a 200.000, inferior a 180.000, inferior a 160.000, inferior a 140.000, inferior a 120.000, inferior a 100.000, inferior a 75.000, inferior a 50.000 o inferior a 25.000. En algunas divulgaciones, el paciente y/o el factor clínico es un recuento de plaquetas inferior a 120.000.

[0273] En divulgaciones particulares, el paciente y/o factor clínico tiene una leucemia. En algunas divulgaciones, el paciente o factor clínico es tener una leucemia de células B. En ciertas divulgaciones, la leucemia es leucemia linfoblástica aguda (ALL), linfoma no Hodgkin (NHL), leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma difuso de grandes células B (DLBCL) o leucemia mieloide aguda (AML). En ciertas divulgaciones, el paciente y/o factor clínico padece leucemia linfocítica aguda (ALL).

- [0274]** En divulgaciones particulares, el paciente y/o factor clínico es una carga de enfermedad alta, por ejemplo, una carga de enfermedad alta antes del inicio de la administración de la composición de células T terapéuticas. En ciertas divulgaciones, el paciente y/o el factor clínico es una carga de enfermedad elevada inmediatamente antes de, o en el plazo de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 9 semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses o más de seis meses antes del inicio de la administración de la composición de células T terapéuticas. En algunas divulgaciones, la alta carga de la enfermedad se determina basándose en el porcentaje de blastos en la médula ósea. En ciertas divulgaciones, la carga elevada de la enfermedad es mayor o igual al 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% o 10% de blastos. En algunas divulgaciones, el paciente y/o el factor clínico es una carga de enfermedad superior al 5% de blastos inmediatamente antes o en el plazo de un mes antes del inicio de la administración de la composición terapéutica de células T. En ciertas divulgaciones, el paciente y/o el factor clínico es una carga de enfermedad elevada, como la suma del diámetro del producto (SPD) o los niveles de lactato deshidrogenasa.
- [0275]** En divulgaciones particulares, el paciente y/o factor clínico es una carga tumoral alta, por ejemplo, una carga de enfermedad alta antes del inicio de la administración de la composición de células T terapéuticas. En algunas divulgaciones, el factor indicativo de la carga tumoral es una medida volumétrica del tumor o tumores. En algunas divulgaciones, la medida volumétrica es una medida de la(s) lesión(es), como el tamaño del tumor, el diámetro del tumor, el volumen del tumor, la masa del tumor, la carga o volumen del tumor, el edema relacionado con el tumor, la necrosis relacionada con el tumor, y/o el número o extensión de las metástasis. En algunas divulgaciones, la medida volumétrica del tumor es una medida bidimensional. Por ejemplo, en algunas divulgaciones, el área de la(s) lesión(es) se calcula como el producto del diámetro más largo y el diámetro perpendicular más largo de todos los tumores medibles. En algunos casos, la medida volumétrica del tumor es una medida unidimensional. En algunos casos, el tamaño de las lesiones medibles se evalúa como el diámetro más largo. En algunas divulgaciones, se mide la suma de los productos de diámetros (SPD), diámetros tumorales más largos (LD), suma de diámetros tumorales más largos (SLD), necrosis, volumen tumoral, volumen de necrosis, relación necrosis-tumor (NTR), edema peritumoral (PTE) y relación edema-tumor (ETR).
- [0276]** Los métodos ejemplares para medir y evaluar la carga tumoral incluyen los descritos en, por ejemplo, Carceller et al., *Pediatr Blood Cancer*. (2016) 63(8): 1400-1406 and Eisenhauer et al., *Eur J Cancer*. (2009) 45(2):228-247. En algunas divulgaciones, el volumétrico es una suma de los productos de los diámetros (SPD) medidos determinando la suma de los productos de los mayores diámetros perpendiculares de todos los tumores medibles. En algunas divulgaciones, el tumor o la lesión se miden en una dimensión con el diámetro más largo (LD) y/o determinando la suma de los diámetros tumorales más largos (SLD) de todas las lesiones medibles. En algunas divulgaciones, la medida volumétrica del tumor es una cuantificación volumétrica de la necrosis tumoral, como el volumen de necrosis y/o la relación necrosis-tumor (NTR), véase Monsky et al., *Anticancer Res*. (2012) 32(11): 4951-4961. En algunas divulgaciones, la medida volumétrica del tumor es una cuantificación volumétrica del edema relacionado con el tumor, como el edema peritumoral (PTE) y/o la relación edema-tumor (ETR). En algunas divulgaciones, la medición puede realizarse utilizando técnicas de imagen como la tomografía computarizada (TC), la tomografía por emisión de positrones (PET) y/o la resonancia magnética (RM) del sujeto.
- [0277]** En algunas divulgaciones, la medida volumétrica es SPD y en algunos casos, el desarrollo de toxicidad, por ejemplo, CRS o NT, se correlaciona con el valor SPD que está por encima de un valor umbral. En algunas divulgaciones, la medida volumétrica es SPD, y el valor umbral es o es aproximadamente 30 por cm², es o es aproximadamente 40 por cm², es o es aproximadamente 50 por cm², es o es aproximadamente 60 por cm², o es o es aproximadamente 70 por cm². En algunas divulgaciones, la medida volumétrica es SPD y el valor umbral es o es aproximadamente 30 por cm², es o es aproximadamente 40 por cm², es o es aproximadamente 50 por cm², es o es aproximadamente 60 por cm², o es o es aproximadamente 70 por cm². En ciertas divulgaciones, el factor clínico y/o del paciente es SPD mayor de 30 por cm², mayor de 40 por cm², mayor de 50 por cm², mayor de 60 por cm², o mayor de 70 por cm².
- [0278]** En algunas divulgaciones, la medida volumétrica del tumor se determina en una sesión de detección, tal como una evaluación de rutina o extracción de sangre para confirmar y/o identificar la condición o enfermedad en el sujeto.
- [0279]** En divulgaciones particulares, el paciente y/o factor clínico es un nivel, cantidad, y/o una concentración de un marcador inflamatorio. En algunas divulgaciones, el marcador inflamatorio es o incluye el nivel o la presencia de proteína C reactiva (PCR), velocidad de sedimentación globular (VSG), albúmina, ferritina, β 2 microglobulina (β 2-M) o lactato deshidrogenasa (LDH) se detecta y evalúa. En algunas divulgaciones, el marcador inflamatorio se evalúa mediante un ensayo inmunológico. Por ejemplo, puede utilizarse un ensayo inmunoenzimático (ELISA), un inmunoensayo enzimático (EIA), un radioinmunoensayo (RIA), una resonancia de plasmón superficial (SPR), un Western Blot, un ensayo de flujo lateral, una inmunohistoquímica, una matriz de proteínas o una inmunocorticografía de protones (iPCR) para detectar el marcador inflamatorio. En algunas divulgaciones, la presencia, nivel, cantidad y/o concentración de un marcador inflamatorio es indicativa de la carga tumoral, por ejemplo, una carga tumoral elevada. En algunos casos, el ensayo o la evaluación de un marcador inflamatorio se realiza mediante citometría de flujo. En algunos casos, el reactivo es una proteína soluble que se une al marcador inflamatorio. En alguna divulgación, el reactivo es una proteína que se une a la proteína C reactiva (PCR), la velocidad de sedimentación globular (VSG), la albúmina, la ferritina, la β 2 microglobulina (β 2-M) o la lactato deshidrogenasa (LDH).

- 5 **[0280]** En algunas divulgaciones, el paciente y/o factor clínico es un nivel, cantidad o concentración de un marcador inflamatorio que es mayor que o mayor que aproximadamente o es 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 75%, 100%, 150%, 1 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces del promedio, mediana o media, y/o es 3, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.8, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, o 0.1 desviación estándar mayor que la mediana o la media, del nivel, cantidad o concentración del marcador inflamatorio medido en muestras obtenidas de un grupo de sujetos antes de recibir la administración de una composición de células T terapéuticas, en el que cada uno de los sujetos del grupo no desarrolló toxicidad de grado 2 o superior, grado 3 o superior, grado 3 o superior prolongado, grado 4 o superior, o grado 5 tras la administración de la composición de células T terapéuticas. En algunas divulgaciones, la toxicidad es neurotoxicidad.
- 10 **[0281]** En algunas divulgaciones, el biomarcador, por ejemplo, marcador inflamatorio es o incluye la proteína C reactiva (PCR). En algunas divulgaciones, la PCR se evalúa mediante un ensayo inmunoenzimático in vitro para obtener una medición cuantitativa de la PCR humana a partir de una muestra como suero, plasma o sangre. En algunas divulgaciones, la PCR se detecta mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA) humano. En algunas divulgaciones, el biomarcador, por ejemplo, marcador inflamatorio es o incluye la velocidad de sedimentación globular (VSG). En algunas divulgaciones, la VSG se evalúa midiendo la distancia (en milímetros por hora) que han descendido los eritrocitos tras separarse del plasma en una pipeta o tubo vertical. En algunas divulgaciones, el biomarcador es o incluye albúmina. En algunas divulgaciones, la albúmina se evalúa mediante una prueba colorimétrica o un ensayo inmunoenzimático in vitro. En algunas divulgaciones, la albúmina se detecta utilizando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) humano. En algunas divulgaciones, el biomarcador, por ejemplo, marcador inflamatorio es o incluye ferritina o $\beta 2$ microglobulina. En algunas divulgaciones, la ferritina o la $\beta 2$ microglobulina se evalúan mediante un inmunoensayo o se detectan mediante un ELISA. En algunas divulgaciones, el biomarcador, por ejemplo, marcador inflamatorio es o incluye la lactato deshidrogenasa (LDH), y la LDH se evalúa utilizando una prueba colorimétrica o un ensayo inmunoenzimático in vitro.
- 15 **[0282]** En algunas divulgaciones, el paciente y/o factor clínico es un nivel, concentración y/o cantidad de LDH. En algunas divulgaciones, el desarrollo de toxicidad, por ejemplo, CRS o NT, se correlaciona con el valor de LDH que está por encima de un valor umbral. En algunas divulgaciones, el marcador inflamatorio es LDH y el valor umbral es o es aproximadamente 300 unidades por litro, es o es aproximadamente 400 unidades por litro, es o es aproximadamente 500 unidades por litro o es o es aproximadamente 600 unidades por litro. En divulgaciones particulares, el paciente y/o el factor de riesgo clínico al menos 300 unidades por litro, al menos 400 unidades por litro, al menos 500 unidades por litro, o al menos 600 unidades por litro.
- 20 **[0283]** En algunas divulgaciones, el nivel, la concentración y/o el número de LDH es un sustituto de la carga de la enfermedad, por ejemplo, para tumores o cánceres, y puede ser útil para la evaluación del riesgo de neurotoxicidad potencial y/o la dosificación adaptada al riesgo o el ajuste del tratamiento de ciertos sujetos. En algunas divulgaciones, los niveles de LDH pueden evaluarse solos y/o en combinación con otro parámetro previo al tratamiento, como otra medida o indicador de la carga de la enfermedad, como una medida volumétrica del tumor como la suma de las dimensiones del producto (SPD) u otra medida volumétrica de la carga de la enfermedad basada en TC o RM, como cualquiera de las descritas en el presente documento. En algunas divulgaciones, se evalúan uno o más parámetros indicativos de la carga de la enfermedad, y en algunos contextos pueden indicar la presencia, ausencia o grado de riesgo de desarrollar neurotoxicidad tras la terapia con células T. En algunas divulgaciones, el uno o más parámetros incluyen LDH y/o una medición volumétrica del tumor. En algunas divulgaciones, el parámetro es SPD y/o LDH.
- 25 **[0284]** En algunas divulgaciones, el paciente y/o factor clínico está recibiendo una quimioterapia puente antes del inicio de la administración de la composición de células T terapéuticas.
- 30 **[0285]** En divulgaciones particulares, el paciente y/o factor clínico es precondicionado con una terapia linfodeplecionante, por ejemplo, antes del inicio de la administración de la composición de células T terapéuticas. En algunas divulgaciones, la terapia de linfodepleción es o incluye la administración de una quimioterapia. En ciertas divulgaciones, la terapia linfodepletor es o incluye la administración de. En divulgaciones particulares, el paciente y/o factor clínico se precondiciona con fludarabina y/o ciclofosfamida antes de iniciar la administración de la composición de células T terapéuticas. En ciertas divulgaciones, el paciente y/o factor clínico se precondiciona con ciclofosfamida antes de iniciar la administración de la composición de células T terapéuticas. En algunas divulgaciones, el paciente y/o factor clínico se precondiciona con fludarabina y ciclofosfamida antes de iniciar la administración de la composición de células T terapéuticas.
- 35 **[0286]** En ciertas divulgaciones, el paciente y/o factor clínico es un subtipo molecular de una enfermedad. En ciertas divulgaciones, el paciente y/o factor clínico es un subtipo molecular de una leucemia. En determinadas divulgaciones, el paciente y/o factor clínico es un subtipo molecular de ALL. En ciertas divulgaciones, el paciente y/o factor clínico es un subtipo molecular de ALL que no es cromosoma Filadelfia positivo (Ph+) o un subtipo molecular de ALL similar al cromosoma Filadelfia (Ph), como un subtipo molecular no Ph. En divulgaciones particulares, los subtipos moleculares no Ph de ALL incluyen, pero no se limitan a, subtipos asociados con una fusión TCF3-PBX1, una fusión ETV6-RUNX1, una fusión EP300-ZNF384, una fusión KMT2A-AFF1, hiperploidía o una anomalía cromosómica dic(9;20), por ejemplo, dic(9;20)(p13.2;q11.2).
- 40 **[0287]** En ciertas divulgaciones, el cromosoma Filadelfia contiene una translocación, t(9;22)(q34;q11), que da lugar a un nuevo gen y proteína quiméricos que fusionan el gen BCR en el cromosoma 22 con el gen que codifica la tirosina quinasa
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

de Abelson (ABL1) en el cromosoma 9. En divulgaciones particulares, el subtipo de ALL similar a Filadelfia (similar a Ph) se caracteriza por firmas de expresión génica relacionadas denominadas "grupo de clúster R8", "similar al cromosoma Filadelfia (Ph)", "similar a Ph", "similar a BCR-ABL1" o una "firma de expresión génica de tirosina quinasa activada". Se ha demostrado que estas firmas de expresión génica son muy similares a los perfiles de expresión génica medidos en sujetos con ALL Ph+, a pesar de que, en algunas divulgaciones, los sujetos similares a Ph no tienen la translocación del cromosoma Filadelfia ni el transcrito de fusión BCR-ABL1. Se han descrito métodos y técnicas para identificar y/o determinar un subtipo Ph+ y/o un subtipo similar a Ph ALL (véase, por ejemplo, Roberts et al., N Engl J Med (2014) 371(11): 1005-1015; Roberts et al. Cancer Cell (2012) 14;22(2):153-66; Perez-Andreu et al. Nature Genetics (2013) 45(12): 1494-1498; Yap et al. Leuk Lymphoma (2017) 58(4): 950-958; Roberts et al. J Clin Oncol (2017) 35(4): 394-401; Harvey et al. Blood (2013) 122:826; Harvey et al., Blood (2010) 116(23): 4874-4884; y Pct App. N.º WO 2013/090419).

[0288] En algunas divulgaciones, el paciente y/o factor clínico es un nivel, cantidad o concentración de una citocina en una muestra de sangre, suero o plasma antes del inicio de la administración de la composición de células T terapéuticas. En algunas divulgaciones, la citocina es una interleucina, por ejemplo, interleucina-15 (IL-15). En divulgaciones particulares, el paciente y/o factor clínico es un nivel, cantidad o concentración elevados de IL-15 en una muestra de sangre antes del inicio de la administración de la composición de células T terapéuticas. En ciertas divulgaciones, el paciente y/o factor clínico es un nivel, cantidad o concentración de IL-15 que es mayor o igual a 1 pg/ mL, 5 pg/ mL, 10 pg/ mL, 15 pg/ mL, 20 pg/ mL, 25 pg/ mL, 30 pg/ mL, 35 pg/ mL, 40 pg/ mL, 45 pg/ mL, 50 pg/ mL, 100 pg/ mL, 150 pg/ mL, 200 pg/ mL, 250 pg/ mL, o 300 pg/ mL en una muestra de sangre, suero o plasma antes del inicio de la administración de la composición terapéutica de células T. En ciertas divulgaciones, el paciente y/o factor clínico es un nivel, cantidad o concentración de IL-15 que es mayor o igual a 30 pg/ mL en una muestra de sangre, suero o plasma antes del inicio de la administración de la composición terapéutica de células T.

[0289] En divulgaciones particulares, el factor del paciente y/o clínico es un nivel, cantidad o concentración de IL-15 que es mayor que o mayor que aproximadamente el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 75%, 100%, 150%, 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces el promedio, mediana o media, y/o es 3, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.8, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 o 0.1 desviaciones estándar mayor que la mediana o media del nivel, cantidad o concentración de IL-15 en muestras de sangre obtenidas de un grupo de sujetos antes de recibir la administración de una composición terapéutica de células T que comprende una dosis de células modificadas con un receptor recombinante, donde ninguno de los sujetos del grupo desarrolló toxicidad de grado 2 o superior, grado 3 o superior, neurotoxicidad prolongada de grado 3 o superior, grado 4 o superior, o toxicidad de grado 5 tras la administración de la composición terapéutica de células T. En algunas divulgaciones, la toxicidad es neurotoxicidad.

[0290] En ciertas divulgaciones, el paciente y/o el factor clínico es una propiedad farmacocinética de la composición celular tras su administración a un sujeto, como es la expansión *in vivo* de células recombinantes que expresan receptores, por ejemplo, células T CAR. En algunas divulgaciones, el parámetro farmacocinético puede incluir la exposición, el número, la concentración, la persistencia y la proliferación. En algunos casos, la farmacocinética puede evaluarse midiendo parámetros como la concentración plasmática máxima (pico) (C_{max}), el tiempo de pico(es decir, cuando se produce la concentración plasmática máxima (C_{max}); T_{max}), la concentración plasmática mínima (es decir, la concentración plasmática mínima entre dosis de un agente terapéutico, por ejemplo, células T CAR+; C_{min}), la semivida de eliminación ($T_{1/2}$) y el área bajo la curva (es decir, el área bajo la curva generada al trazar el tiempo frente a la concentración plasmática del agente terapéutico células T CAR+; AUC), tras la administración. La concentración de un agente terapéutico concreto, por ejemplo, células T CAR+, en el plasma tras la administración puede medirse utilizando cualquier método conocido en la técnica adecuado para evaluar las concentraciones de los agentes terapéuticos, por ejemplo, células T CAR+, en muestras de sangre, o cualquier método descrito en el presente documento. Por ejemplo, pueden utilizarse métodos basados en ácidos nucleicos, como la PCR cuantitativa (qPCR) o métodos basados en citometría de flujo, u otros ensayos, como un inmunoensayo, ELISA o ensayos basados en cromatografía/espectrometría de masas.

[0291] En algunas divulgaciones, la farmacocinética (PK) de las células administradas, por ejemplo, la composición de células T CAR+, se determina para evaluar la disponibilidad, por ejemplo, la biodisponibilidad, de las células administradas. En algunas divulgaciones, los parámetros farmacocinéticos determinados de las células administradas incluyen concentraciones plasmáticas máximas (pico) (C_{max}), tales como C_{max} de células CAR+ CD3+, células CAR+ CD4+ y/o células T CAR+ CD8+; el punto temporal en el que se alcanza la C_{max} (T_{max}), como la T_{max} de células CAR+ CD3+, células CAR+ CD4+ y/o células T CAR+ CD8+, y/o el área bajo la curva (AUC), como la AUC_{0-28} , de células CAR+ CD3+, células CAR+ CD4+ y/o células T CAR+ CD8+. En algunas divulgaciones, el parámetro farmacocinético es la concentración máxima de células T CD3+ CAR+ (C_{max} células T CD3+ CAR+), o la concentración de células T CD8+ CAR+ (C_{max} células T CD8+ CAR+). En algunas divulgaciones, el parámetro farmacocinético es AUC_{0-28} , de células T CAR+ CD3+, (AUC_{0-28} células T CAR+ CD3+), o AUC_{0-28} , de células T CAR+ CD8+, (AUC_{0-28} de células T CAR+ CD8+).

[0292] La exposición, *p. ej.*, el número o la concentración de células, *p. ej.* Las células T administradas para la terapia celular T, indicativas de expansión y/o persistencia, pueden expresarse en términos de número máximo o concentración de las células a las que se expone el sujeto, duración de las células detectables o células por encima de un determinado número o porcentaje, área bajo la curva (AUC) para el número o concentración de células a lo largo del tiempo, y/o combinaciones de las mismas e indicadores de las mismas. Dichos resultados pueden evaluarse mediante métodos conocidos, como la qPCR para detectar el número de copias del ácido nucleico que codifica el receptor recombinante en

comparación con la cantidad total de ácido nucleico o ADN en la muestra concreta, *por ej.*, sangre, suero, plasma o tejido, como una muestra tumoral, y/o ensayos de citometría de flujo que detectan células que expresan el receptor utilizando generalmente anticuerpos específicos para los receptores. También pueden utilizarse ensayos celulares para detectar el número, porcentaje o concentración de células funcionales, como células capaces de unirse a y/o neutralizar y/o inducir respuestas, *por ejemplo*, citotóxicas, contra células de la enfermedad o afección o que expresan el antígeno reconocido por el receptor.

[0293] En algunas divulgaciones, la exposición puede establecerse como el área bajo la curva de concentración-tiempo del agente terapéutico (AUC) determinada mediante análisis farmacocinético tras la administración de una dosis del agente terapéutico, *por ejemplo*, células T CAR+. En algunos casos, el AUC se expresa en células*días/ μ L, para células administradas en terapia celular, o en unidades correspondientes de las mismas. En algunas divulgaciones, la AUC se mide como una AUC media en una población de pacientes, tal como una población de pacientes de muestra, *por ejemplo*, la AUC media de uno o más pacientes. En algunas divulgaciones, la exposición sistémica se refiere al área bajo la curva (AUC) en un determinado periodo de tiempo, *por ejemplo* desde el día 0 hasta el día 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 21, 28 días o más, o la semana 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más, o el mes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 24, 48 o más. En algunas divulgaciones, el AUC se mide como un AUC desde el día 0 hasta el día 28 (AUC₀₋₂₈) después de la administración del agente terapéutico, *por ejemplo*, células T CAR+, incluyendo todos los datos medidos y los datos extrapolados de parámetros farmacocinéticos (PK) medidos, como un AUC medio de una población de pacientes, como una población de pacientes de muestra. En algunas divulgaciones, para determinar la exposición a lo largo del tiempo, *p. ej.*, AUC durante un cierto periodo de tiempo, tal como AUC₀₋₂₈, se genera una curva concentración-tiempo del agente terapéutico, utilizando múltiples mediciones o evaluación de parámetros, *p. ej.*, concentraciones celulares, a lo largo del tiempo, *p. ej.*, mediciones tomadas cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 21 o 28 días o más.

[0294] En algunas divulgaciones, se determina la presencia y/o cantidad de células que expresan el receptor recombinante (*p. ej.*, células que expresan CAR administradas para terapia basada en células T) en el sujeto tras la administración de las células T. En algunas divulgaciones, se utilizan métodos basados en ácidos nucleicos, como la PCR cuantitativa (qPCR), para evaluar la cantidad de células que expresan el receptor recombinante (*p. ej.*, células que expresan CAR administradas para una terapia basada en células T) en la sangre o el suero o en una muestra de órgano (*p. ej.*, sitio de la enfermedad, *p. ej.*, muestra de tumor) del sujeto. En algunas divulgaciones, la persistencia se cuantifica como copias de ADN o plásmido que codifica el receptor, *por ejemplo*, CAR, por microgramo de ADN, o como el número de células que expresan el receptor, *p. ej.*, CAR, por microlitro de la muestra, *por ejemplo*, de sangre o suero, o por número total de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o glóbulos blancos o células T por microlitro de la muestra. En algunas divulgaciones, los cebadores o sondas utilizados para la qPCR u otros métodos basados en ácidos nucleicos son específicos para unir, reconocer y/o amplificar ácidos nucleicos que codifican el receptor recombinante, y/o otros componentes o elementos del plásmido y/o vector, incluyendo elementos reguladores, *p. ej.*, promotores, elementos reguladores transcripcionales y/o postranscripcionales o elementos de respuesta, o marcadores, *p. ej.*, marcadores sustitutos. En algunas divulgaciones, los cebadores pueden ser específicos para elementos reguladores, como el elemento regulador postranscripcional (WPRE) del virus de la hepatitis de la marmota.

[0295] En algunas divulgaciones, las células se detectan en el sujeto en o al menos a los 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 15, 27 o 28 días después de la administración de las células T, *por ejemplo*, células T que expresan CAR. En algunas divulgaciones, las células se detectan en o al menos a las 2, 4, o 6 semanas siguientes, o 3, 6, o 12, 18, o 24, o 30 o 36 meses, o 1, 2, 3, 4, 5, o más años, tras la administración de las células T, *por ejemplo*, células T que expresan CAR. En algunas divulgaciones, las células que expresan el receptor son detectables en el suero, plasma, sangre o tejido, *por ejemplo*, muestra tumoral, del sujeto, *p. ej.*, mediante un método específico, como qPCR o método de detección basado en citometría de flujo.

[0296] En algunas divulgaciones, las células que expresan el receptor, *p. ej.* células que expresan CAR, se expanden en el sujeto tras la administración de las células T, *por ejemplo*, células T que expresan CAR. En algunas divulgaciones, el aumento de la exposición del sujeto a las células incluye el aumento de la expansión de las células. Como se muestra en el presente documento, el aumento de la expansión que ocurre temprano, *por ejemplo*, dentro de los 7 días, tales como 4-7 días, después de la administración de la terapia celular se asocia, se correlaciona y / o puede ser indicativo del riesgo de riesgo probable de desarrollar una toxicidad. En algunas divulgaciones, se divulgan métodos en los que se monitoriza a los sujetos para determinar las propiedades farmacocinéticas de las células recombinantes con expresión de receptor administradas y, si se detecta una expansión temprana o rápida, se pueden administrar a un sujeto uno o más agentes para mejorar la toxicidad o un riesgo de toxicidad o un riesgo probable de toxicidad. Se conocen agentes ejemplares para mejorar la toxicidad y se describen, *por ejemplo*, en la Sección IV.E.

[0297] En divulgaciones particulares, el parámetro farmacocinético es un número de células que expresan receptores recombinantes que es indicativo de una expansión temprana o rápida de las células en el sujeto. En algunas divulgaciones, dicha expansión detectable puede demostrarse si se detectan al menos, en o aproximadamente 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 125, 150 o 200 células que expresan receptores recombinantes por microlitro en una muestra de sangre o suero recogida en un plazo de cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece o catorce o más de catorce días tras el inicio de la administración de la terapia celular. En algunas divulgaciones, el parámetro farmacocinético es un número de células que expresan receptores recombinantes que es al menos, en, o

aproximadamente 2 células que expresan receptores recombinantes por microlitro en una muestra de sangre o suero recogida en los cuatro días siguientes al inicio de la administración. En divulgaciones particulares, el parámetro farmacocinético es un número de células que expresan receptores recombinantes que es al menos, en, o
 5 aproximadamente 5 células que expresan receptores recombinantes por microlitro en una muestra de sangre o suero recogida en los cinco o seis días siguientes al inicio de la administración. En algunas divulgaciones, el parámetro farmacocinético es un número de células que expresan receptores recombinantes que es al menos, en, o
 10 aproximadamente 10 células que expresan receptores recombinantes por microlitro en una muestra de sangre o suero recogida en un plazo de cinco o seis días después del inicio de la administración. En divulgaciones particulares, el parámetro farmacocinético es un número de células que expresan receptores recombinantes que es al menos, en, o
 15 aproximadamente 15 células que expresan receptores recombinantes por microlitro en una muestra de sangre o suero recogida en los siete días siguientes al inicio de la administración.

[0298] En divulgaciones particulares, se divulgan en el presente documento métodos de diseño de un ensayo para administrar una composición terapéutica de células T. En algunas divulgaciones, los métodos comprenden la asignación
 15 de un sujeto a un régimen de tratamiento basado en la presencia o ausencia de uno o más factores de riesgo del paciente y/o clínicos, como cualquiera de los descritos. En algunas divulgaciones, un sujeto que no tiene, o no se identifica o se considera que tiene, un paciente y/o factor clínico y se asigna para recibir una dosis de una composición de células T terapéuticas. En divulgaciones particulares, un sujeto tiene, o se identifica o se considera que tiene, un paciente y/o factor
 20 clínico, y se le asigna para que se le administre una dosis reducida y/o menor de células. En ciertas divulgaciones, la dosis reducida y/o inferior es o es al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% menor que la dosis que se administra a un sujeto sin un paciente y/o factor clínico. En ciertas divulgaciones, no hay diferencia sustancial en la incidencia de toxicidad, por ejemplo, efectos secundarios adversos graves, CRS, y/o neurotoxicidad, entre los sujetos sin un paciente y/o factor clínico a los que se administra la dosis de células y los sujetos
 25 con un paciente y/o factor clínico a los que se administra la dosis inferior de células.

[0299] En ciertas divulgaciones, se asigna al sujeto la administración de la dosis baja o reducida si el sujeto tiene uno o más factores del paciente y/o clínicos que pueden incluir, pero no se limitan a, (i) sujetos que han recibido menos terapias previas, opcionalmente menos de dos terapias previas, antes del inicio de la administración de la composición terapéutica
 30 de células T, (ii) sujetos de edad joven, opcionalmente menos de 30 años, (iii) sujetos en los que la proporción de CD4:CD8 en una muestra de aféresis del sujeto está por debajo de cierto umbral, opcionalmente por debajo de 1:1 o por debajo de 15:1 o inferior a 0.5:1 o inferior, opcionalmente en el que la dosis administrada se basa en el total de células T o en el total de células T que expresan un receptor recombinante; (iv) sujetos con un peso superior al peso medio entre el grupo de sujetos tratados; (v) sujetos con un recuento de plaquetas inferior o aproximadamente inferior a 120.000; (vi) sujetos con una leucemia de células B, opcionalmente leucemia linfocítica aguda (ALL); (vii) sujetos con una carga de enfermedad
 35 elevada antes de, por ejemplo, inmediatamente antes de o en el plazo de un mes antes de, iniciar la administración de la composición de células T terapéuticas, opcionalmente según se determine en función del porcentaje de blastos de médula ósea mayor o igual al 5%, la suma del diámetro del producto (SPD) o los niveles de lactato deshidrogenasa; (ix) sujetos que hayan recibido una quimioterapia puente antes de iniciar la administración de la composición de células T terapéuticas; (x) sujetos que han sido precondicionados con una terapia de linfodepleción, que opcionalmente
 40 comprende la administración de fludarabina y/o ciclofosfamida, antes del inicio de la administración de la composición celular T terapéutica; (xi) sujetos en los que el nivel, la cantidad o la concentración de interleucina-15 (IL-15) en una muestra de sangre antes del inicio de la administración de la composición de células T terapéuticas es superior o igual a un valor umbral, opcionalmente en los que el valor umbral es de 30 pg/ mL de plasma, (xii) expansión rápida in vivo de las células que expresan los receptores recombinantes, (xiii) sujetos que no presentan un cromosoma Filadelfia (Ph+) y/o
 45 un subtipo molecular similar al cromosoma Ph (similar a Ph) de leucemia linfoblástica aguda (LLA).

C. Resultado de la respuesta

[0300] En algunas divulgaciones, puede monitorizarse o evaluarse un resultado de respuesta en un sujeto tras la
 50 administración de la composición de células T. En algunas divulgaciones, el resultado de la respuesta es ninguna respuesta. En algunas divulgaciones, el resultado de la respuesta es una respuesta parcial. En algunas divulgaciones, el resultado de la respuesta es una respuesta completa (CR). En algunas divulgaciones, el resultado de la respuesta se evalúa monitorizando la carga de la enfermedad en el sujeto. En algunas divulgaciones, se puede evaluar la ausencia de respuesta, una respuesta parcial o una respuesta clínica o completa.

[0301] En algunas divulgaciones, una respuesta parcial o una respuesta completa es aquella en la que el agente
 55 terapéutico reduce o previene la expansión o la carga de la enfermedad o afección en el sujeto. Por ejemplo, cuando la enfermedad o afección es un tumor, la reducción de la carga de la enfermedad existe o está presente si hay una reducción del tamaño del tumor, la masa, la metástasis, el porcentaje de blastos en la médula ósea o el cáncer detectable molecularmente y/o una mejora del pronóstico o la supervivencia u otro síntoma asociado con la carga tumoral en
 60 comparación con antes del tratamiento con el agente terapéutico (por ejemplo, células T CAR).

[0302] En algunas divulgaciones, la enfermedad o condición es un tumor y una reducción en la carga de la enfermedad
 65 es una reducción en el tamaño del tumor. En algunas divulgaciones, la reducción de la carga de enfermedad se indica mediante una reducción de uno o más factores, como la carga o el número de células enfermas en el sujeto o fluido u órgano o tejido del mismo, la masa o volumen de un tumor, o el grado o extensión de las metástasis. En algunas

divulgaciones, la carga de la enfermedad, por ejemplo, la carga tumoral, puede evaluarse o monitorizarse para determinar el alcance de la enfermedad morfológica y/o la enfermedad residual mínima.

[0303] En algunas divulgaciones, la carga de una enfermedad o condición en el sujeto es detectada, evaluada o medida. La carga de enfermedad puede detectarse en algunas divulgaciones detectando el número total de células enfermas o asociadas a la enfermedad, por ejemplo, células tumorales, en el sujeto, o en un órgano, tejido o fluido corporal del sujeto, como sangre o suero. En algunas divulgaciones, la carga de la enfermedad, por ejemplo la carga tumoral, se evalúa midiendo la masa de un tumor sólido y/o el número o extensión de las metástasis. En algunas divulgaciones, se evalúa la supervivencia del sujeto, la supervivencia dentro de un periodo de tiempo determinado, el alcance de la supervivencia, la presencia o duración de la supervivencia libre de eventos o libre de síntomas, o la supervivencia libre de recaídas. En algunas divulgaciones, se evalúa cualquier síntoma de la enfermedad o afección. En algunas divulgaciones, se especifica la medida de la carga de la enfermedad o afección.

[0304] En algunas divulgaciones, la carga de la enfermedad puede abarcar un número total de células de la enfermedad en el sujeto o en un órgano, tejido o fluido corporal del sujeto, como el órgano o tejido del tumor u otra ubicación, por ejemplo, que indicaría metástasis. Por ejemplo, las células tumorales pueden detectarse y/o cuantificarse en la sangre o la médula ósea en el contexto de determinadas neoplasias hematológicas. La carga de la enfermedad puede incluir, en algunas divulgaciones, la masa de un tumor, el número o la extensión de las metástasis y/o el porcentaje de células blásticas presentes en la médula ósea.

[0305] En algunas divulgaciones, un sujeto tiene leucemia. El alcance de la carga de la enfermedad puede determinarse mediante la evaluación de la leucemia residual en sangre o médula ósea.

[0306] En algunas divulgaciones, existe un resultado de respuesta si hay una reducción en el porcentaje de blastos en la médula ósea en comparación con el porcentaje de blastos en la médula ósea antes del tratamiento con el agente terapéutico. En algunas divulgaciones, la reducción de la carga de la enfermedad existe si hay una disminución o reducción de al menos o aproximadamente 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más en el número o porcentaje de blastos en la médula ósea en comparación con el número o porcentaje de blastos en la médula ósea antes del tratamiento.

[0307] En algunas divulgaciones, el sujeto exhibe una respuesta si el sujeto no exhibe enfermedad morfológica (enfermedad no morfológica) o no exhibe enfermedad morfológica sustancial. En algunas divulgaciones, un sujeto presenta enfermedad morfológica si hay más o igual al 5% de blastos en la médula ósea, por ejemplo, detectados por microscopía óptica. En algunas divulgaciones, un sujeto presenta remisión completa o clínica si hay menos de un 5% de blastos en la médula ósea.

[0308] En algunas divulgaciones, un sujeto exhibe carga de enfermedad reducida o disminuida si exhibía enfermedad morfológica antes del tratamiento y exhibe remisión completa (p. ej., menos del 5% de blastos en la médula ósea) con o sin enfermedad molecular (p. ej., enfermedad residual mínima (ERM) que es molecularmente detectable, p. ej., detectada por citometría de flujo o PCR cuantitativa) después del tratamiento. En algunas divulgaciones, un sujeto exhibe carga de enfermedad reducida o disminuida si exhibía enfermedad molecular antes del tratamiento y no exhibe enfermedad molecular después del tratamiento.

[0309] En algunas divulgaciones, un sujeto puede mostrar una remisión completa, pero una pequeña proporción de células leucémicas residuales morfológicamente indetectables (por técnicas de microscopía de luz) están presentes. Se dice que un sujeto presenta enfermedad residual mínima (ERM) si el sujeto presenta menos del 5% de blastos en la médula ósea y presenta cáncer detectable molecularmente. En algunas divulgaciones, el cáncer detectable molecularmente puede evaluarse utilizando cualquiera de una variedad de técnicas moleculares que permiten la detección sensible de un pequeño número de células. En algunas divulgaciones, dichas técnicas incluyen ensayos de PCR, que pueden determinar reordenamientos únicos de genes receptores de células Ig/T o transcritos de fusión producidos por translocaciones cromosómicas. En algunas divulgaciones, la citometría de flujo puede utilizarse para identificar células cancerosas basándose en inmunofenotipos específicos de la leucemia. En algunas divulgaciones, la detección molecular del cáncer puede detectar tan sólo 1 célula leucémica o blástica en 100.000 células normales o 1 célula leucémica o blástica en 10.000 células normales. En algunas divulgaciones, un sujeto exhibe MRD que es molecularmente detectable si se detecta al menos o más de 1 célula de leucemia en 100.000 células, como por PCR o citometría de flujo.

[0310] En algunas divulgaciones, la carga de la enfermedad de un sujeto es molecularmente indetectable o MRD; tal que, en algunos casos, no se pueden detectar células leucémicas en el sujeto utilizando técnicas de PCR o citometría de flujo.

[0311] En algunas divulgaciones, el resultado de la respuesta es la ausencia de una CR o la presencia de una respuesta completa en la que el sujeto alcanza o exhibe una enfermedad residual mínima o un estado de enfermedad molecular detectable. En algunas divulgaciones, el resultado de la respuesta es la presencia de una CR con enfermedad molecularmente detectable o la presencia de una CR sin enfermedad molecularmente detectable. En algunas divulgaciones, se evalúa la carga de la enfermedad en los sujetos mediante métodos como los descritos en el presente documento, como los métodos que evalúan los blastos en la médula ósea o la enfermedad molecular mediante citometría de flujo o métodos de qPCR.

[0312] Tras la administración de las células, se mide la actividad biológica de las poblaciones celulares manipuladas en algunas divulgaciones, por ejemplo, mediante cualquiera de los métodos conocidos. Los parámetros a evaluar incluyen la unión específica de una célula T natural o modificada o de otra célula inmunitaria al antígeno, *in vivo*, por ejemplo, mediante imágenes, o *ex vivo*, por ejemplo, mediante ELISA o citometría de flujo. En ciertas divulgaciones, la capacidad de las células modificadas para destruir las células diana puede medirse utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica, como los ensayos de citotoxicidad descritos en, por ejemplo, Kochenderfer et al., J. Immunotherapy, 32(7): 689-702 (2009), and Herman et al. J. Immunological Methods, 285(1): 25-40 (2004). En ciertas divulgaciones, la actividad biológica de las células se mide analizando la expresión y/o secreción de una o más citocinas, como CD 107a, IFN γ , IL-2 y TNF. En algunas divulgaciones, la actividad biológica se mide evaluando el resultado clínico, como la reducción de la carga tumoral.

D. Agente para mejorar o tratar la toxicidad

[0313] En algunas divulgaciones, los métodos aquí divulgados se relacionan con la monitorización de sujetos para riesgo o riesgo probable de toxicidad, y/o la identificación de sujetos que están en riesgo o riesgo probable de desarrollar una toxicidad, por ejemplo, una toxicidad grave, tal como CRS grave o neurotoxicidad grave, después de la administración de la terapia celular que comprende células que expresan un receptor recombinante (por ejemplo, CAR). En algunas divulgaciones, los métodos incluyen la administración de uno o más agentes o terapias que tratan una toxicidad de la terapia celular, como CRS o neurotoxicidad, por ejemplo, CRS grave o neurotoxicidad grave). En algunas divulgaciones, el agente se administra en un momento en el que se determina que el sujeto está en riesgo de desarrollar una toxicidad, como una toxicidad grave, y/o en un momento en el que se han manifestado uno o más signos o síntomas de la toxicidad.

[0314] En algunas divulgaciones, el agente es un esteroide. En algunas divulgaciones, el agente es un antagonista o inhibidor de un receptor de citocina, como el receptor de IL-6, el receptor CD122 (receptor de IL-2R β) o CCR2, o es un inhibidor de una citocina, como IL-6, MCP-1, IL-10, IFN- γ , IL-8 o IL-18. En algunas divulgaciones, el agente es un agonista de un receptor de citocina y/o citocina, tal como TGF- β . En algunas divulgaciones, el agente, por ejemplo, agonista, antagonista o inhibidor, es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, una molécula pequeña, una proteína o péptido, o un ácido nucleico.

[0315] En algunas divulgaciones, un bolo de fluido puede ser empleado como una intervención, tal como para tratar la hipotensión asociada con CRS. En algunas divulgaciones, los niveles de hematocrito objetivo son >24%. En algunas divulgaciones, la intervención incluye el uso de tecnología de resina absorbente con filtración de sangre o plasma. En algunos casos, la intervención incluye diálisis, plasmaféresis o tecnologías similares. En algunas divulgaciones, pueden emplearse vasopresores o paracetamol.

1. Steroid

[0316] En algunas divulgaciones, el agente que trata y/o que previene, retrasa, o atenúa el desarrollo de o el riesgo de desarrollar una toxicidad a la terapia celular, tal como grado 2 o superior o severa CRS o neurotoxicidad, es un esteroide, por ejemplo, corticosteroide. Los corticosteroides suelen incluir glucocorticoides y mineralocorticoides.

[0317] Cualquier corticosteroide, por ejemplo, glucocorticoide, puede usarse en los métodos aquí divulgados. En algunas divulgaciones, los glucocorticoides incluyen glucocorticoides sintéticos y no sintéticos. Los glucocorticoides ejemplares incluyen, pero no se limitan a: alclometasonas, algestonas, beclometasonas (por ejemplo, dipropionato de beclometasona), betametasonas (por ejemplo, 17-valerato de betametasona, acetato sódico de betametasona, fosfato sódico de betametasona, valerato de betametasona), budesónidas, clobetasoles (por ejemplo, propionato de clobetasol), clobetasonas, clocortolonas (por ejemplo, pivalato de clocortolona), pivalato de clocortolona), cloprednol, corticosteronas, cortisonas e hidrocortisonas (por ejemplo, acetato de hidrocortisona), cortivazoles, deflazacorts, desonidas, desoximetasonas, dexametasonas (por ejemplo dexametasona 21-fosfato, dexametasona acetato, dexametasona fosfato sódico), diflorasonas (por ejemplo, diflorasona diacetato), diflucortolonas, difluprednatos, enoxolonas, fluazacorts, flucoronidas, fludrocortisonas (por ejemplo, acetato de fludrocortisona), flumetasonas (p. ej., pivalato de flumetasona), flunisólidos, fluocinolonas (p. ej., acetónido de fluocinolona), fluocinónidos, fluocortinas, fluocortolonas, fluorometolonas (p. ej., acetato de fluorometolona), fluperolonas (p. ej., acetato de fluperolona), acetato de fluperolona), fluprednidenos, fluprednisolonas, flurandrenólidos, fluticasonas (p. ej. propionato de fluticasona), formocortales, halcinónidos, halobetasoles, halometasonas, halopredonas, hidrocortamatos, hidrocortisonas (p. ej. hidrocortisona 21-butilato, hidrocortisona aceponato, hidrocortisona acetato, hidrocortisona buteptrato, hidrocortisona butirato, hidrocortisona cipionato, hidrocortisona hemisuccinato, hidrocortisona probutato, hidrocortisona fosfato sódico, hidrocortisona succinato sódico, valerato de hidrocortisona), etabonato de loteprednol, mazipredonas, medrisonas, meprednisonas, metilprednisolonas (aceponato de metilprednisolona, acetato de metilprednisolona, hemisuccinato de metilprednisolona, succinato sódico de metilprednisolona), mometasonas (p. ej., aceponato de metilprednisolona, acetato de metilprednisolona, hemisuccinato de metilprednisolona, succinato sódico de metilprednisolona), g., furoato de mometasona), parametasonas (p. ej., acetato de parametasona), prednicarbatos, prednisolonas (p. ej. prednisolona 25-dietilaminoacetato, prednisolona fosfato sódico, prednisolona 21-hemisuccinato, prednisolona acetato; prednisolona farnesilato, prednisolona hemisuccinato, prednisolona-21 (beta-D-glucurónido), prednisolona metasulfobenzoato, prednisolona esteaglatato, prednisolona tebutato, prednisolona tetrahidroftalato), prednisonas, prednivalas, prednilidenos,

rimexolonas, tixocortoles, triamcinolonas (p. ej., triamcinolona ac.p. ej. acetónido de triamcinolona, benetónido de triamcinolona, hexacetónido de triamcinolona, acetónido de triamcinolona 21-palmitato, diacetato de triamcinolona). Estos glucocorticoides y sus sales se tratan en detalle, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol, ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (16ª ed. 1980).

[0318] En algunas divulgaciones, el glucocorticoide se selecciona entre cortisonas, dexametasonas, hidrocortisonas, metilprednisolonas, prednisolonas y prednisonas. En una divulgación particular, el glucocorticoide es dexametasona.

[0319] En algunas divulgaciones, el agente es un corticosteroide y se administra en una cantidad que es terapéuticamente eficaz para tratar, mejorar o reducir uno o más síntomas de una toxicidad de la terapia celular, tal como CRS o neurotoxicidad. En algunas divulgaciones, los indicadores de mejora o de éxito del tratamiento incluyen la determinación de la no manifestación de una puntuación relevante en la escala de clasificación de la toxicidad (por ejemplo, la escala de clasificación del CRS o de la neurotoxicidad), como una puntuación inferior a 3, o un cambio en la clasificación o la gravedad en la escala de clasificación según se expone en el presente documento, como un cambio de una puntuación de 4 a una puntuación de 3.

[0320] En algunas divulgaciones, el corticosteroide se proporciona en una dosis terapéuticamente eficaz. La concentración terapéuticamente eficaz puede determinarse empíricamente mediante pruebas en sistemas conocidos in vitro o in vivo (por ejemplo, modelos animales). Por ejemplo, la cantidad de un corticosteroide seleccionado que debe administrarse para mejorar los síntomas o los efectos adversos de una toxicidad de una terapia celular, como el CRS o la neurotoxicidad, puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar. Además, pueden emplearse modelos animales para ayudar a identificar los intervalos de dosis óptimos. La posología precisa, que puede determinarse empíricamente, puede depender del preparado terapéutico concreto, del régimen y el calendario de dosificación, de la vía de administración y de la gravedad de la enfermedad.

[0321] El corticosteroide puede administrarse en cualquier cantidad que sea eficaz para mejorar uno o más síntomas asociados con la toxicidad, como con el CRS o la neurotoxicidad. El corticosteroide, por ejemplo, glucocorticoide, puede administrarse, por ejemplo, en una cantidad comprendida entre 0,1 y 100 mg, por dosis, 0,1 y 80 mg, 0,1 y 60 mg, 0,1 y 40 mg, 0,1 y 30 mg, 0,1 y 20 mg, 0,1 y 15 mg, 0,1 y 10 mg, 0,1 y 5 mg, 0,2 y 40 mg, 0,2 a 30 mg, 0,2 a 20 mg, 0,2 a 15 mg, 0,2 a 10 mg, 0,2 a 5 mg, 0,4 a 40 mg, 0,4 a 30 mg, 0,4 a 20 mg, 0,4 a 15 mg, 0,4 a 10 mg, 0,4 a 5 mg, 0,4 a 4 mg, 1 a 20 mg, 1 a 15 mg o 1 a 10 mg, cada uno inclusive, a un sujeto humano adulto de 70 kg. Típicamente, el corticosteroide, tal como un glucocorticoide, se administra en una cantidad entre 0,4 mg y 20 mg, por ejemplo, 0,4 mg, 0,5 mg, 0,6 mg, 0,7 mg, 0,75 mg, 0,8 mg, 0,9 mg, 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg, 10 mg, 11 mg, 12 mg, 13 mg, 14 mg, 15 mg, 16 mg, 17 mg, 18 mg, 19 mg o 20 mg por dosis, a un sujeto humano adulto medio.

[0322] En algunas divulgaciones, el corticosteroide puede administrarse, por ejemplo, a una dosis de al menos aproximadamente 0,001 mg/kg (del sujeto), 0,002 mg/kg, 0,003 mg/kg, 0,004 mg/kg, 0,005 mg/kg, 0,006 mg/kg, 0,007 mg/kg, 0,008 mg/kg, 0,009 mg/kg, 0,01 mg/kg, 0,015 mg/kg, 0,02 mg/kg, 0,025 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,035 mg/kg, 0,04 mg/kg, 0,045 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,055 mg/kg, 0,06 mg/kg, 0,065 mg/kg, 0,07 mg/kg, 0,075 mg/kg, 0,08 mg/kg, 0,085 mg/kg, 0,09 mg/kg, 0,095 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,15 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,30 mg/kg, 0,35 mg/kg, 0,40 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,50 mg/kg, 0,55 mg/kg, 0,60 mg/kg, 0,65 mg/kg, 0,70 mg/kg, 0,75 mg/kg, 0,80 mg/kg, 0,85 mg/kg, 0,90 mg/kg, 0,95 mg/kg, 1 mg/kg, 1,05 mg/kg, 1,1 mg/kg, 1,15 mg/kg, 1,20 mg/kg, 1,25 mg/kg, 1,3 mg/kg, 1,35 mg/kg o 1,4 mg/kg, a un sujeto humano adulto medio, que suele pesar entre 70 kg y 75 kg.

[0323] El corticosteroide, o glucocorticoide, por ejemplo la dexametasona, puede administrarse por vía oral (comprimidos, líquido o concentrado líquido), PO, intravenosa (IV), intramuscular o por cualquier otra vía conocida o descrita en el presente documento (por ejemplo, con respecto a las formulaciones farmacéuticas). En algunas divulgaciones, el corticosteroide se administra como un bolo, y en otras divulgaciones puede administrarse durante un período de tiempo.

[0324] En algunas divulgaciones, el glucocorticoide puede ser administrado durante un período de más de un día, tal como durante dos días, durante 3 días, o durante 4 o más días. En algunas divulgaciones, el corticosteroide puede administrarse una vez al día, dos veces al día, o tres veces o más al día. Por ejemplo, el corticosteroide, como la dexametasona, puede administrarse en algunos casos a razón de 10 mg (o equivalente) por vía intravenosa dos veces al día durante tres días.

[0325] En algunas divulgaciones, la dosis de corticosteroide, por ejemplo, glucocorticoide, se administra en dosis sucesivamente más bajas por tratamiento. Por lo tanto, en algunos de estos regímenes de tratamiento, la dosis de corticosteroides se reduce gradualmente. Por ejemplo, el corticosteroide puede administrarse a una dosis inicial (o dosis equivalente, como en el caso de la dexametasona) de 4 mg, y en cada administración sucesiva la dosis puede reducirse, de forma que la dosis sea de 3 mg en la siguiente administración, de 2 mg en la siguiente administración y de 1 mg en la siguiente administración.

[0326] Generalmente, la dosis de corticosteroide administrada depende del corticosteroide específico, ya que existe una diferencia de potencia entre los diferentes corticosteroides. Normalmente se entiende que los fármacos varían en potencia y que, por lo tanto, las dosis pueden variar para obtener efectos equivalentes. La Tabla 4 muestra la equivalencia en

términos de potencia para diversos glucocorticoides y vías de administración. La potencia equivalente en la dosificación clínica es bien conocida. La información relativa a la dosificación equivalente de esteroides (de forma no cronoterapéutica) puede encontrarse en el British National Formulary (BNF), 37 de marzo de 1999.

TABLA 4: Administración de glucocorticoides	
Glucocorticoide (Ruta)	Potencia de Equivalencia
Hidrocortisona (IV o PO)	20
Prednisona	5
Prednisolona (IV o PO)	5
Succinato de sodio de metilprednisolona (IV)	4
Dexametasona (IV o PO)	0.5-0.75

[0327] Así, en algunas divulgaciones, el esteroide se administra en una cantidad de dosificación equivalente de o de aproximadamente 1,0 mg a 20 mg de dexametasona por día, tal como 1,0 mg a 15 mg de dexametasona por día, 1,0 mg a 10 mg de dexametasona por día, 2,0 mg a 8 mg de dexametasona por día, o 2,0 mg a 6,0 mg de dexametasona por día, cada uno inclusive. En algunos casos, el esteroide se administra en una dosis equivalente de al menos 4 mg o de al menos 8 mg de dexametasona al día.

[0328] En algunas divulgaciones, el esteroide se administra si la fiebre persiste después del tratamiento con tocilizumab. Por ejemplo, en algunas divulgaciones, la dexametasona se administra por vía oral o intravenosa a una dosis de 5-10 mg hasta cada 6-12 horas con fiebres continuas. En algunas divulgaciones, tocilizumab se administra simultáneamente o después de la administración de suplementos de oxígeno.

2. Otros agentes

[0329] En algunas divulgaciones, el agente que trata o mejora los síntomas de una toxicidad de una terapia celular, tal como CRS o neurotoxicidad, es uno que se dirige a una citoquina, por ej. es un antagonista o inhibidor de una citocina, como el factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), la interleucina 6 (IL-6), la interleucina 10 (IL-10), la IL-2, el MIP1β (CCL4), el TNF alfa, la IL-1, el interferón gamma (IFN-gamma) o la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1). En algunas divulgaciones, el agente que trata o mejora los síntomas de una toxicidad de una terapia celular, como el CRS o la neurotoxicidad, es uno que se dirige a (p. ej. inhibe o es un antagonista de) un receptor de citocina, como el receptor de IL-6 (IL-6R), el receptor de IL-2 (IL-2R/CD25), el receptor de MCP-1 (CCL2) (CCR2 o CCR4), un receptor de TGF-beta (TGF-beta I, II o III), el receptor de IFN-gamma (IFNGR), el receptor de MIP1β (por ejemplo, CCR5), receptor de TNF alfa (por ejemplo, TNFR1), receptor de IL-1 (IL1-Rα/IL-1Rβ) o receptor de IL-10 (IL-10R).

[0330] La cantidad de un agente seleccionado que trata o mejora los síntomas de una toxicidad de una terapia celular, como el CRS o la neurotoxicidad que debe administrarse para mejorar los síntomas o efectos adversos de una toxicidad de una terapia celular, como el CRS o la neurotoxicidad, puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar. Los efectos adversos ejemplares incluyen, entre otros, un aumento de la alanina aminotransferasa, un aumento de la aspartato aminotransferasa, escalofríos, neutropenia febril, cefalea, hipotensión, disfunción ventricular izquierda, encefalopatía, hidrocefalia, convulsiones y/o temblor.

[0331] En algunas divulgaciones, el agente se administra en una cantidad de dosificación de o de aproximadamente 30 mg a 5000 mg, tal como 50 mg a 1000 mg, 50 mg a 500 mg, 50 mg a 200 mg, 50 mg a 100 mg, 100 mg a 1000 mg, 100 mg a 500 mg, 100 mg a 200 mg, 200 mg a 1000 mg, 200 mg a 500 mg o 500 mg a 1000 mg.

[0332] En algunas divulgaciones, el agente se administra desde o desde aproximadamente 0.5 mg/kg a 100 mg/kg, tal como de o de aproximadamente 1 mg/kg a 50 mg/kg, 1 mg/kg a 25 mg/kg, 1 mg/kg a 10 mg/kg, 1 mg/kg a 5 mg/kg, 5 mg/kg a 100 mg/kg, 5 mg/kg a 50 mg/kg, 5 mg/kg a 25 mg/kg, 5 mg/kg a 10 mg/kg, 10 mg/kg a 100 mg/kg, 10 mg/kg a 50 mg/kg, 10 mg/kg a 25 mg/kg, 25 mg/kg a 100 mg/kg, 25 mg/kg a 50 mg/kg a 50 mg/kg a 100 mg/kg. En algunas divulgaciones, el agente se administra en una cantidad de dosificación de o aproximadamente 1 mg/kg a 10 mg/kg, 2 mg/kg a 8 mg/kg, 2 mg/kg a 6 mg/kg, 2 mg/kg a 4 mg/kg o 6 mg/kg a 8 mg/kg, cada uno inclusive. En algunas divulgaciones, el agente se administra en una cantidad de dosificación de al menos o aproximadamente 1 mg/kg, 2 mg/kg, 4 mg/kg, 6 mg/kg, 8 mg/kg, 10 mg/kg o más. En algunas divulgaciones, el agente se administra a una dosis de 4 mg/kg u 8 mg/kg.

[0333] En algunas divulgaciones, el agente se administra por inyección, por ejemplo, inyecciones intravenosas o subcutáneas, inyección intraocular, inyección periocular, inyección subretiniana, inyección intravítrea, inyección transseptal, inyección subescleral, inyección intracordea, inyección intracameral, inyección subconjuntival, inyección subconjuntival, inyección sub-Tenon's, inyección retrobulbar, inyección peribulbar, o administración yuxtasccleral posterior. En algunas divulgaciones, se administran por vía parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para el tratamiento

local, intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea.

[0334] En algunas divulgaciones, la cantidad del agente se administra alrededor o aproximadamente dos veces al día, diariamente, cada dos días, tres veces a la semana, semanalmente, cada dos semanas o una vez al mes.

[0335] En algunas divulgaciones, el agente se administra como parte de una composición o formulación, tal como una composición o formulación farmacéutica como se describe a continuación. Así, en algunos casos, la composición que comprende el agente se administra como se describe a continuación. En otras divulgaciones, el agente se administra solo y puede administrarse por cualquier vía de administración aceptable conocida o por una descrita en el presente documento, como con respecto a composiciones y formulaciones farmacéuticas.

[0336] En algunas divulgaciones, el agente que trata o mejora los síntomas de una toxicidad de la terapia celular, como el CRS o la neurotoxicidad, es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En algunas divulgaciones, el agente es tocilizumab, siltuximab, sarilumab, olokizumab (CDP6038), elsilimomab, ALD518/BMS-945429, sirukumab (CNTO 136), CPSI-2634, ARGX-109, FE301 o FM101.

[0337] En algunas divulgaciones, el agente es un antagonista o inhibidor de IL-6 o del receptor de IL-6 (IL-6R). En algunas divulgaciones, el agente es un anticuerpo que neutraliza la actividad de IL-6, como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une a IL-6 o IL-6R. Por ejemplo, en algunas divulgaciones, el agente es o comprende tocilizumab (atlizumab) o sarilumab, anticuerpos anti-IL-6R. En algunas divulgaciones, el agente es un anticuerpo anti-IL-6R descrito en la Patente de EEUU N.º 8,562,991. En algunos casos, el agente que se dirige a la IL-6 es un anticuerpo anti-IL-6, como siltuximab, elsilimomab, ALD518/BMS-945429, sirukumab (CNTO 136), CPSI-2634, ARGX-109, FE301, FM101 u olokizumab (CDP6038). En algunas divulgaciones, el agente puede neutralizar la actividad de IL-6 inhibiendo las interacciones ligando-receptor. La viabilidad de este tipo general de enfoque se ha demostrado con un antagonista natural del receptor de la interleucina-1. Véase Harmurn, C. H. et al., Nature (1990) 343:336-340. En algunas divulgaciones, el antagonista o inhibidor de IL-6/IL-6R es una muteína de IL-6, como la descrita en la Patente de EE. UU. N.º 5591827. En algunas divulgaciones, el agente que es un antagonista o inhibidor de IL-6/IL-6R es una molécula pequeña, una proteína o péptido, o un ácido nucleico.

[0338] En algunas divulgaciones, el agente es tocilizumab. En algunas divulgaciones, tocilizumab se administra como una intervención temprana de acuerdo con los métodos divulgados una dosis de o de aproximadamente 1 mg/kg a 12 mg/kg, tal como en o aproximadamente 4 mg/kg, 8 mg/kg o 10 mg/kg. En algunas divulgaciones, tocilizumab se administra mediante infusión intravenosa. En algunas divulgaciones, tocilizumab se administra para una fiebre persistente de más de 39°C que dura 10 horas y que no responde al paracetamol. En algunas divulgaciones, se proporciona una segunda administración de tocilizumab si los síntomas reaparecen después de 48 horas de la dosis inicial.

[0339] En algunas divulgaciones, el agente es un agonista o estimulador de TGF- β o un receptor de TGF- β (por ejemplo, receptor de TGF- β I, II o III). En algunas divulgaciones, el agente es un anticuerpo que aumenta la actividad de TGF- β , tal como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une a TGF- β o a uno de sus receptores. En algunas divulgaciones, el agente que es un agonista o estimulador de TGF- β y/o su receptor es una molécula pequeña, una proteína o péptido, o un ácido nucleico.

[0340] En algunas divulgaciones, el agente es un antagonista o inhibidor de MCP-1 (CCL2) o un receptor de MCP-1 (por ejemplo, receptor de MCP-1 CCR2 o CCR4). En algunas divulgaciones, el agente es un anticuerpo que neutraliza la actividad de MCP-1, como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une a MCP-1 o a uno de sus receptores (CCR2 o CCR4). En algunas divulgaciones, el antagonista o inhibidor de MCP-1 es cualquiera descrito en Gong et al. J Exp Med. 1997 o Shahrara et al. J Immunol 2008; 180:3447-3456. En algunas divulgaciones, el agente que es un antagonista o inhibidor de MCP-1 y/o su receptor (CCR2 o CCR4) es una molécula pequeña, una proteína o péptido, o un ácido nucleico.

[0341] En algunas divulgaciones, el agente es un antagonista o inhibidor de IFN- γ o un receptor de IFN- γ (IFNGR). En algunas divulgaciones, el agente es un anticuerpo que neutraliza la actividad del IFN- γ , como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une al IFN- γ o a su receptor (IFNGR). En algunas divulgaciones, el anticuerpo neutralizante de IFN-gamma es cualquiera descrito en Dobber et al. Cell Immunol. 1995 Feb;160(2):185-92 or Ozmen et al. J Immunol. 1993. En algunas divulgaciones, el agente que es un antagonista o inhibidor de IFN- γ /IFNGR es una molécula pequeña, una proteína o péptido, o un ácido nucleico.

[0342] En algunas divulgaciones, el agente es un antagonista o inhibidor de IL-10 o del receptor de IL-10 (IL-10R). En algunas divulgaciones, el agente es un anticuerpo que neutraliza la actividad de IL-10, como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une a IL-10 o IL-10R. En algunas divulgaciones, el anticuerpo neutralizante de IL-10 es cualquiera descrito en Dobber et al. Cell Immunol. 1995 Feb;160(2):185-92 or Hunter et al. J Immunol. 2005. En algunas divulgaciones, el agente que es un antagonista o inhibidor de IL-10/IL-10R es una molécula pequeña, una proteína o péptido, o un ácido nucleico.

V. CÉLULAS GENETICAMENTE MODIFICADAS

[0343] En el presente documento se describen células manipuladas que expresan uno o más receptores de antígenos recombinantes. En algunas divulgaciones, las células pueden incluir células modificadas genéticamente con un receptor recombinante, como un receptor de antígeno quimérico.

A. Receptores de antígenos recombinantes

[0344] Se dan a conocer células manipuladas, como células T, que expresan un receptor recombinante, incluidos receptores quiméricos que contienen dominios de unión a ligando o fragmentos de unión de los mismos, como receptores antigénicos funcionales no TCR, como receptores antigénicos quiméricos (CAR), y también incluidos receptores de células T (TCR), como TCR transgénicos, y componentes de los mismos. El receptor quimérico, como un CAR, generalmente incluye el dominio de unión al antígeno (o ligando) extracelular unido a uno o más componentes de señalización intracelular, en algunas divulgaciones mediante enlazadores y/o dominio(s) transmembrana(s).

1. Receptores quiméricos de antígenos

[0345] Entre los receptores de antígenos ejemplares, incluidos los CAR, y los métodos de ingeniería e introducción de dichos receptores en las células, se incluyen los descritos, por ejemplo, en los números de publicación de solicitud de patente internacional WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061 números de publicación de solicitud de Patente de EE. UU. US2002131960, US2013287748, US20130149337, Patentes de EE.UU. N.º 6.451.995, 7.446.190, 8.252.592, 8.339.645, 8.398.282, 7.446.179, 6.410.319, 7.070.995, 7.265.209, 7.354.762, 7.446.191, 8.324.353, 8.479.118, y 3.4.342, y la solicitud de patente europea número EP2537416, y/o las descritas por Sadelain et al, Cancer Discov., 3(4): 388-398 (2013); Davila et al. PLoS ONE 8(4): e61338 (2013); Turtle et al., Curr. Opin. Immunol., 24(5): 633-39 (2012); Wu et al., Cancer, 18(2): 160-75 (2012). En algunas divulgaciones, los receptores de antígeno incluyen un CAR como se describe en la Patente de EEUU N.º: 7.446.190, y los descritos en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N.º: WO/2014055668 A1. Entre los ejemplos de CAR se incluyen los CAR divulgados en cualquiera de las publicaciones mencionadas, como WO2014031687, US 8,339,645, US 7,446,179, US 2013/0149337, Patente de EEUU N.º: 7,446,190, Patentes de EE.UU. N.º: 8,389,282, Kochenderfer et al., Nature Reviews Clinical Oncology, 10, 267-276 (2013); Wang et al., J. Immunother. 35(9): 689-701 (2012); and Brentjens et al., Sci Transl Med. 5(177) (2013). Véase también WO2014031687, US 8,339,645, US 7,446,179, US 2013/0149337, Patente de EEUU N.º: 7,446,190, y la Patente de EE. UU. núm: 8,389,282. Los receptores quiméricos, como los CAR, generalmente incluyen un dominio extracelular de unión a antígeno, como una porción de una molécula de anticuerpo, generalmente una región de cadena pesada variable (V_H) y/o una región de cadena ligera variable (V_L) del anticuerpo, *p. ej.*, un fragmento de anticuerpo scFv.

[0346] En algunas divulgaciones, el receptor recombinante, por ejemplo, el receptor de antígeno contiene un dominio extracelular de unión a antígeno o ligando que se une, por ejemplo, se une específicamente, a un antígeno, un ligando y/o un marcador. Entre los receptores antigénicos se encuentran los receptores antigénicos funcionales no TCR, como los receptores antigénicos quiméricos (CAR). En algunas divulgaciones, el receptor antigénico es un CAR que contiene un dominio extracelular de reconocimiento de antígeno que se une específicamente a un antígeno. En algunas divulgaciones, el CAR se construye con una especificidad para un antígeno, marcador o ligando particular, como un antígeno expresado en un tipo celular particular al que se dirige la terapia adoptiva, *p. ej.*, un marcador de cáncer, y/o un antígeno destinado a inducir una respuesta amortiguadora, como un antígeno expresado en un tipo celular normal o no enfermo. Así, el CAR incluye típicamente en su porción extracelular una o más moléculas de unión a ligando (por ejemplo, antígeno), como uno o más fragmentos, dominios o porciones de unión a antígeno, o uno o más dominios variables de anticuerpo, y/o moléculas de anticuerpo. En algunas divulgaciones, el CAR incluye una porción o porciones de unión a antígeno de una molécula de anticuerpo, como un fragmento de anticuerpo de cadena única (scFv) derivado de las cadenas pesada variable (V_H) y ligera variable (V_L) de un anticuerpo monoclonal (mAb), o un anticuerpo de dominio único (sdAb), como sdFv, nanobody, V_HH y V_{NAR}. En algunas divulgaciones, un fragmento de unión a antígeno comprende regiones variables de anticuerpo unidas por un enlazador flexible.

[0347] En algunas divulgaciones, entre los antígenos a los que se dirigen los receptores quiméricos se encuentran aquellos expresados en el contexto de una enfermedad, afección o tipo celular a los que se dirigirá la terapia celular adoptiva. Entre las enfermedades y afecciones se encuentran enfermedades y trastornos proliferativos, neoplásicos y malignos, como cánceres y tumores, incluidos cánceres hematológicos, cánceres del sistema inmunitario, como linfomas, leucemias y/o mielomas, como leucemias B, T y mieloides, linfomas y mielomas múltiples. En algunas divulgaciones, el antígeno al que se dirige el receptor es un polipéptido. En algunas divulgaciones, se trata de un carbohidrato u otra molécula. En algunas divulgaciones, el antígeno se expresa selectivamente o se sobreexpresa en células de la enfermedad o afección, por ejemplo, el tumor o las células patógenas, en comparación con células o tejidos normales o no dirigidos, por ejemplo, en células o tejidos sanos. En otras divulgaciones, el antígeno se expresa en las células normales y/o se expresa en las células manipuladas.

[0348] Los antígenos a los que se dirigen los receptores en algunas divulgaciones incluyen el receptor de tirosina quinasa huérano ROR1, tEGFR, Her2, LI-CAM, CD19, CD20, CD22, mesotelina, CEA, y antígeno de superficie de hepatitis B, receptor antifolato, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, EGP-2, EGP-4, OEPHa2, ErbB2, 3, o 4, FBP, receptor de acetilcolina fetal, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-alfa, IL-13R-alfa2, kdr, cadena ligera kappa, Lewis Y, molécula de

adhesión celular L1, MAGE-A1, mesotelina, MUC1, MUC16, PSCA, ligandos NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, antígeno oncofetal, ROR1, TAG72, VEGF-R2, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno prostático específico, PSMA, Her2/neu, receptor de estrógenos, receptor de progesterona, efrinB2, CD 123, c-Met, GD-2, y MAGE A3, CE7, tumor de Wilms 1 (WT-1), una ciclina, como la ciclina A1 (CCNA1), y/o moléculas biotiniladas, y/o moléculas expresadas por el HIV, HCV, HBV u otros patógenos.

[0349] En algunas divulgaciones, los antígenos dirigidos por los receptores incluyen el integrin $\alpha\beta 6$ (integrina $\alpha\beta 6$), el antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA), B7-H3, B7-H6, la anhidrasa carbónica 9 (CA9, también conocida como CAIX o G250), un antígeno de cáncer-testículo, antígeno de cáncer/testículo 1B (CTAG, también conocido como NY-ESO-1 y LAGE-2), antígeno carcinoembrionario (CEA), una ciclina, ciclina A2, quimiocina C-C motivo ligando 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD138, CD171, proteína del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), factor de crecimiento epidérmico truncado (tEGFR), mutación del receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo III (EGFRvIII), glicoproteína epitelial 2 (EPG-2), glicoproteína epitelial 40 (EPG-40), efrinaB2, receptor de efrina A2 (EPHa2), receptor de estrógeno, receptor similar a Fc 5 (FCRL5; también conocido como homólogo del receptor Fc 5 o FCRH5), receptor fetal de acetilcolina (AChR fetal), unión a folato proteína de unión a folato alfa, receptor fetal de acetilcolina, gangliósido GD2, GD2 O-acetilado (OGD2), gangliósido GD3, glicoproteína 100 (gp100), Receptor Acoplado a Proteínas G 5D (GPCR5D), Her2/neu (receptor tirosina quinasa erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), dímeros de erbB, antígeno asociado al melanoma de alto peso molecular humano (HMW-MAA), antígeno de superficie de hepatitis B, antígeno leucocitario humano A1 (HLA-A1A1), antígeno leucocitario humano A2 (HLA-A2), receptor de IL-22 alfa (IL-22Ra), receptor de IL-13 alfa 2 (IL-13Ra2), receptor inserto de dominio quinasa (kdr), cadena ligera kappa, molécula de adhesión celular L1 (L1-CAM), epítipo CE7 de L1-CAM, miembro de la familia A con repetición rica en leucina 8 (LRRRC8A), Lewis Y, antígeno asociado al melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, mesotelina, c-Met, citomegalovirus murino (CMV), mucina 1 (MUC1), MUC16, ligandos del receptor NKG2D (miembro D del grupo 2 de células asesinas naturales), melan A (MART-1), molécula de adhesión celular neural (NCAM), antígeno oncofetal, antígeno preferencialmente expresado de melanoma (PRAME), receptor de progesterona, un antígeno específico de próstata, antígeno de células madre de próstata (PSCA), antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), receptor tirosina quinasa similar a receptor huérfano 1 (ROR1), survivina, glicoproteína de trofoblasto (TPBG también conocida como 5T4), glicoproteína asociada al tumor 72 (TAG72), receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 2 (VEGFR2), Tumor de Wilms 1 (WT-1), un antígeno específico de patógenos o un antígeno asociado con una marcación universal, y/o moléculas biotiniladas, y/o moléculas expresadas por HIV, HCV, HBV u otros patógenos. Los antígenos a los que se dirigen los receptores en algunas divulgaciones incluyen antígenos asociados con una neoplasia de células B, como cualquiera de una serie de marcadores de células B conocidos. En algunas divulgaciones, el antígeno al que se dirige el receptor es o incluye CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Igkappa, Iglambda, CD79a, CD79b o CD30.

[0350] En algunas divulgaciones, el CAR se une a un antígeno patógeno-específico. En algunas divulgaciones, el CAR es específico para antígenos virales (como un antígeno viral del HIV, HCV, HBV, etc.), antígenos bacterianos y/o antígenos parasitarios.

[0351] En algunas divulgaciones, el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, scFv o dominio V_H) reconoce específicamente un antígeno, tal como CD19. En algunas divulgaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se deriva de, o es una variante de, anticuerpos o fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a CD19.

[0352] En algunas divulgaciones los dominios scFv y/o V_H se derivan de FMC63. FMC63 se refiere generalmente a un anticuerpo monoclonal IgG1 de ratón criado contra células Nalm-1 y -16 que expresan CD19 de origen humano (Ling, N. R., *et al.* (1987). Tipificación leucocitaria III. 302). El anticuerpo FMC63 comprende la CDR H1 establecida en SEQ ID N.º: 38; CDR H2, que figura en SEQ ID N.º:39; CDR H3, que figura en SEQ ID N.º: 40 o 54; y CDR L1 establecida en SEQ ID N.º: 35; CDR L2 se establece en SEQ ID N.º:36 o 55; y CDR L3 se establece en SEQ ID N.º:37 o 56. El anticuerpo FMC63 comprende la región variable de la cadena pesada (V_H) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 41 y la región variable de la cadena ligera (V_L) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 42. En algunas divulgaciones, el scFv comprende una cadena ligera variable que contiene una secuencia CDR L1 de SEQ ID N.º:35, una secuencia CDR L2 de SEQ ID N.º:36, y una secuencia CDR L3 de SEQ ID N.º:37 y/o una cadena pesada variable que contiene una secuencia CDR H1 de SEQ ID N.º:38, una secuencia CDR H2 de SEQ ID N.º:39, y una secuencia CDR H3 de SEQ ID N.º:40, o una variante de cualquiera de las anteriores que tenga al menos un 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con la misma. En algunas divulgaciones, el scFv comprende una región variable de cadena pesada de FMC63 establecida en SEQ ID N.º:41 y una región variable de cadena ligera de FMC63 establecida en SEQ ID N.º:42, o una variante de cualquiera de las anteriores que tenga al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más identidad de secuencia con la misma. En algunas divulgaciones, las cadenas pesada variable y ligera variable están conectadas por un enlazador. En algunas divulgaciones, el enlazador se establece en SEQ ID N.º:58. En algunas divulgaciones, el scFv comprende, en orden, una V_H , un enlazador y una V_L . En algunas divulgaciones, el scFv comprende, en orden, una V_L , un enlazador y una V_H . En algunas divulgaciones, el scFv está codificado por una secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID N.º:57 o una secuencia que exhibe al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID N.º:57. En algunas divulgaciones, el scFv comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:43 o una secuencia que presenta al menos 85%, 86%, 87%, 88%,

89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID N.º:43.

[0353] En algunas divulgaciones, el scFv y/o dominio V_H se deriva de SJ25C1. SJ25C1 es un anticuerpo monoclonal IgG1 de ratón criado contra células Nalm-1 y -16 que expresan CD19 de origen humano (Ling, N. R., *et al.* (1987). Tipificación leucocitaria III. 302). El anticuerpo SJ25C1 comprende CDR H1, H2 y H3 establecidos en SEQ ID N.º: 47-49, respectivamente, y las secuencias CDR L1, L2 y L3 establecidas en SEQ ID N.º: 44-46, respectivamente. El anticuerpo SJ25C1 comprende la región variable de la cadena pesada (V_H) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 50 y la región variable de la cadena ligera (V_L) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 51. En algunas divulgaciones, el svFv comprende una cadena ligera variable que contiene una secuencia CDR L1 establecida en SEQ ID N.º:44; una CDR L2 establecida en SEQ ID N.º: 45; y una CDR L3 establecida en SEQ ID N.º:46; y/o una cadena pesada variable que contiene una CDR H1 establecida en SEQ ID N.º:47, una CDR H2 establecida en SEQ ID N.º:48, y una CDR H3 establecida en SEQ ID N.º:49, o una variante de cualquiera de las anteriores que tenga al menos un 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con la misma. En algunas divulgaciones, el scFv comprende una región de cadena pesada variable de SJ25C1 establecida en SEQ ID N.º:50 y una región de cadena ligera variable de SJ25C1 establecida en SEQ ID N.º:51, o una variante de cualquiera de las anteriores que tenga al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más identidad de secuencia con la misma. En algunas divulgaciones, las cadenas pesada variable y ligera variable están conectadas por un enlazador. En algunas divulgaciones, el enlazador se establece en SEQ ID N.º:52. En algunas divulgaciones, el scFv comprende, en orden, una V_H, un enlazador y una V_L. En algunas divulgaciones, el scFv comprende, en orden, una V_L, un enlazador y una V_H. En algunas divulgaciones, el scFv comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID N.º:53 o una secuencia que presenta al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID N.º:53.

[0354] En algunas divulgaciones, el CAR contiene un dominio de unión a ligando (p. ej., antígeno) que se une o reconoce, p. ej., se une específicamente, una marcación universal o un epítipo universal. En algunas divulgaciones, el dominio de unión puede unir una molécula, una marcación, un polipéptido y/o un epítipo que puede unirse a una molécula de unión diferente (por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno) que reconoce un antígeno asociado con una enfermedad o trastorno. Una marcación o epítipo ejemplar incluye un colorante (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína) o una biotina. En algunas divulgaciones, una molécula de unión (por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno) unida a una marcación que reconoce el antígeno asociado con una enfermedad o trastorno, por ejemplo, antígeno tumoral, con una célula de ingeniería que expresa un CAR específico para la marcación, para efectuar la citotoxicidad u otra función efectora de la célula de ingeniería. En algunas divulgaciones, la especificidad del CAR para el antígeno asociado con una enfermedad o trastorno se divulga mediante la molécula de unión marcada (por ejemplo, anticuerpo), y se pueden utilizar diferentes moléculas de unión marcadas para dirigirse a diferentes antígenos. Entre los CAR ejemplares específicos para una marcación universal o un epítipo universal se incluyen los descritos, por ejemplo, en la 9,233,125, WO 2016/030414, Urbanska et al., (2012) Cancer Res 72: 1844-1852, and Tamada et al., (2012). Clin Cancer Res 18:6436-6445.

[0355] En algunas divulgaciones, el CAR contiene un anticuerpo similar al TCR, como un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno (p. ej. scFv) que reconoce específicamente un antígeno intracelular, como un antígeno asociado a tumor, presentado en la superficie celular como un complejo peptídico del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). En algunas divulgaciones, un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo que reconoce un complejo MHC-péptido puede expresarse en células como parte de un receptor recombinante, tal como un receptor de antígeno. Entre los receptores de antígenos se encuentran los receptores de antígenos funcionales que no son receptores de células T (TCR), como los receptores de antígenos quiméricos (CAR). En algunas divulgaciones, un CAR que contiene un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que muestra una especificidad similar al TCR dirigida contra complejos péptido-MHC también puede denominarse CAR similar al TCR. En algunas divulgaciones, el CAR es un CAR de tipo TCR y el antígeno es un antígeno peptídico procesado, como un antígeno peptídico de una proteína intracelular, que, como un TCR, se reconoce en la superficie celular en el contexto de una molécula MHC. En algunas divulgaciones, el dominio de unión a antígeno extracelular específico para un complejo MHC-péptido de un CAR similar a TCR está unido a uno o más componentes de señalización intracelular, en algunas divulgaciones mediante enlazadores y/o dominio(s) transmembrana(s). En algunas divulgaciones, tales moléculas pueden típicamente imitar o aproximar una señal a través de un receptor de antígeno natural, tal como un TCR, y, opcionalmente, una señal a través de tal receptor en combinación con un receptor coestimulador.

[0356] La referencia al "complejo mayor de histocompatibilidad" (MHC) se refiere a una proteína, generalmente una glicoproteína, que contiene un sitio de unión a péptidos polimórficos o ranura de unión que puede, en algunos casos, formar complejos con antígenos peptídicos de polipéptidos, incluyendo antígenos peptídicos procesados por la maquinaria celular. En algunos casos, las moléculas MHC pueden mostrarse o expresarse en la superficie celular, incluso como un complejo con péptido, es decir Complejo MHC-péptido, para la presentación de un antígeno en una conformación reconocible por un receptor de antígeno en células T, como un TCR o un anticuerpo similar al TCR. En general, las moléculas MHC de clase I son heterodímeros que tienen una cadena α que abarca toda la membrana, en algunos casos con tres dominios α , y una microglobulina β 2 asociada de forma no covalente. En general, las moléculas MHC de clase II están compuestas por dos glicoproteínas transmembrana, α y β , que normalmente abarcan la membrana. Una molécula CMH puede incluir una porción efectiva de un MHC que contenga un sitio o sitios de unión a un antígeno para unir un péptido y las secuencias necesarias para el reconocimiento por el receptor de antígeno apropiado. En algunas

divulgaciones, las moléculas MHC de clase I transportan péptidos originados en el citosol a la superficie celular, donde un complejo MHC-péptido es reconocido por células T, como generalmente las células T CD8⁺, pero en algunos casos las células T CD4⁺. En algunas divulgaciones, las moléculas MHC de clase II transportan péptidos originados en el sistema vesicular a la superficie celular, donde suelen ser reconocidos por los linfocitos T CD4⁺. En general, las moléculas MHC están codificadas por un grupo de loci vinculados, que se denominan colectivamente H-2 en el ratón y antígeno leucocitario humano (HLA) en el ser humano. Por ello, el MHC humano también puede denominarse antígeno leucocitario humano (HLA).

[0357] El término "complejo MHC-péptido" o "complejo péptido-MHC" o variaciones del mismo, se refiere a un complejo o asociación de un antígeno peptídico y una molécula MHC, como, generalmente, por interacciones no covalentes del péptido en el surco o hendidura de unión de la molécula MHC. En algunas divulgaciones, el complejo MHC-péptido está presente o se muestra en la superficie de las células. En algunas divulgaciones, el complejo MHC-péptido puede ser reconocido específicamente por un receptor de antígeno, como un TCR, un CAR de tipo TCR, o porciones de unión a antígeno del mismo.

[0358] En algunas divulgaciones, un péptido, tal como un antígeno peptídico o epítipo, de un polipéptido puede asociarse con una molécula MHC, tal como para reconocimiento por un receptor de antígeno. Generalmente, el péptido se deriva o se basa en un fragmento de una molécula biológica más larga, como un polipéptido o una proteína. En algunas divulgaciones, el péptido suele tener entre 8 y 24 aminoácidos de longitud. En algunas divulgaciones, un péptido tiene una longitud de o de aproximadamente 9 a 22 aminoácidos para su reconocimiento en el complejo MHC Clase II. En algunas divulgaciones, un péptido tiene una longitud de o aproximadamente de 8 a 13 aminoácidos para su reconocimiento en el complejo MHC Clase I. En algunas divulgaciones, tras el reconocimiento del péptido en el contexto de una molécula MHC, tal como el complejo MHC-péptido, el receptor de antígeno, tal como TCR o un CAR de tipo TCR, produce o desencadena una señal de activación a la célula T que induce una respuesta de célula T, tal como proliferación de célula T, producción de citocinas, una respuesta de célula T citotóxica u otra respuesta.

[0359] En algunas divulgaciones, un anticuerpo similar al TCR o una porción de unión a antígeno, son conocidos o pueden producirse por métodos conocidos (véase, por ejemplo, la solicitud publicada en EE.UU. Nos. US 2002/0150914; US 2003/0223994; US 2004/0191260; US 2006/0034850; US 2007/00992530; US20090226474; US20090304679; y International App. de Pat. de EE.UU. N° WO2011/068201).

[0360] En algunas divulgaciones, un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un complejo MHC-péptido puede producirse inmunizando a un huésped con una cantidad eficaz de un inmunógeno que contiene un complejo MHC-péptido específico. En algunos casos, el péptido del complejo MHC-péptido es un epítipo de antígeno capaz de unirse al MHC, como un antígeno tumoral, por ejemplo un antígeno tumoral universal, un antígeno de mieloma u otro antígeno como se describe más adelante. En algunas divulgaciones, se administra entonces una cantidad eficaz del inmunógeno a un huésped para provocar una respuesta inmunitaria, en la que el inmunógeno retiene una forma tridimensional del mismo durante un periodo de tiempo suficiente para provocar una respuesta inmunitaria contra la presentación tridimensional del péptido en el surco de unión de la molécula del MHC. A continuación, se analiza el suero recogido del huésped para determinar si se producen los anticuerpos deseados que reconocen una presentación tridimensional del péptido en el surco de unión de la molécula del MHC. En algunas divulgaciones, los anticuerpos producidos pueden evaluarse para confirmar que el anticuerpo puede diferenciar el complejo MHC-péptido de la molécula MHC sola, el péptido de interés solo, y un complejo de MHC y péptido irrelevante. A continuación, se pueden aislar los anticuerpos deseados.

[0361] En algunas divulgaciones, un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un complejo MHC-péptido puede producirse empleando métodos de visualización de bibliotecas de anticuerpos, tales como bibliotecas de anticuerpos de fagos. En algunas divulgaciones, se pueden generar bibliotecas de visualización de fagos de Fab mutantes, scFv u otras formas de anticuerpos, por ejemplo, en las que los miembros de la biblioteca están mutados en uno o más residuos de una CDR o CDRs. Véase, *p. ej.* Pat. de EE.UU. Pat. de EE.UU. de Pat. de EE.UU. N.º US20020150914, US20140294841; and Cohen C.J. et al. (2003) J Mol. Recogn. 16:324-332.

[0362] El término "anticuerpo" aquí se utiliza en el sentido más amplio e incluye anticuerpos policlonales y monoclonales, incluidos anticuerpos intactos y fragmentos funcionales (de unión al antígeno), como fragmentos de unión al antígeno (Fab), fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fab', fragmentos Fv, fragmentos recombinantes de IgG (rIgG), regiones de cadena pesada variable (V_H) capaces de unirse específicamente al antígeno, fragmentos de anticuerpos de cadena única, incluidos fragmentos de cadena variable de una sola cadena (scFv), y anticuerpos de un solo dominio (por ejemplo, sdAb, sdFv, nanocuerpo, V_HH o V_{NAR}) o fragmentos. El término abarca formas de inmunoglobulinas modificadas genéticamente y/o de otro modo, como intracuerpos, pepticuerpos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos totalmente humanos, anticuerpos humanizados y anticuerpos heteroconjugados, anticuerpos multiespecíficos, por ejemplo, bispecíficos, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos, di-scFv en tándem, tri-scFv en tándem. A menos que se indique lo contrario, debe entenderse que el término "anticuerpo" engloba los fragmentos funcionales de anticuerpo de los mismos. El término también abarca los anticuerpos intactos o de longitud completa, incluidos los anticuerpos de cualquier clase o subclase, incluidas las IgG y sus subclases, IgM, IgE, IgA e IgD. En algunas divulgaciones, el CAR es un CAR bispecífico, por ejemplo, que contiene dos dominios de unión a antígeno con diferentes especificidades.

- [0363]** En algunas divulgaciones, las proteínas de unión a antígeno, los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos reconocen específicamente un antígeno de un anticuerpo de longitud completa. En algunas divulgaciones, las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo pueden ser de longitud completa o pueden ser una porción de unión a antígeno (un Fab, F(ab')₂, Fv o un fragmento Fv de cadena simple (scFv)). En otras divulgaciones, la región constante de la cadena pesada del anticuerpo se elige entre, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD, e IgE, particularmente elegida entre, *p. ej.*, IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4, más particularmente, IgG1 (*p. ej.*, IgG1 humana). En otra divulgación, la región constante de la cadena ligera del anticuerpo se elige entre, *p. ej.*, kappa o lambda, particularmente kappa.
- [0364]** Entre los anticuerpos divulgados hay fragmentos de anticuerpos. Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, diacuerpos; anticuerpos lineales; regiones de cadena pesada variable (V_H), moléculas de anticuerpo de cadena única como scFvs y anticuerpos V_H de cadena única; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. En determinadas divulgaciones, los anticuerpos son fragmentos de anticuerpo de cadena simple que comprenden una región variable de cadena pesada y/o una región variable de cadena ligera, como scFvs.
- [0365]** El término "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que participa en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera (V_H y V_L, respectivamente) de un anticuerpo nativo suelen tener estructuras similares, y cada dominio consta de cuatro regiones base (FR) conservadas y tres CDR. (Véase, *p. ej.*, Kindt et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., página 91 (2007)). Un solo dominio V_H o V_L puede ser suficiente para conferir especificidad de unión al antígeno. Además, los anticuerpos que se unen a un antígeno concreto pueden aislarse utilizando un dominio V_H o V_L de un anticuerpo que se une al antígeno para cribar una biblioteca de dominios V_L o V_H complementarios, respectivamente. Véase, *p. ej.*, Portolano et al., J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991).
- [0366]** Los anticuerpos de dominio único (sdAb) son fragmentos de anticuerpo que comprenden todo o parte del dominio variable de cadena pesada o todo o parte del dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo. En ciertas divulgaciones, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo humano de dominio único. En algunas divulgaciones, el CAR comprende un dominio de cadena pesada de anticuerpo que se une específicamente al antígeno, tal como un marcador de cáncer o antígeno de superficie celular de una célula o enfermedad a la que se dirige, tal como una célula tumoral o una célula cancerosa, tal como cualquiera de los antígenos diana descritos en el presente documento o conocidos. Algunos ejemplos de anticuerpos de dominio único son sdFv, nanocuerpo, V_HH o V_{NAR}.
- [0367]** Los fragmentos de anticuerpo pueden fabricarse mediante diversas técnicas, incluyendo pero sin limitarse a la digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como la producción mediante células huésped recombinantes. En algunas divulgaciones, los anticuerpos son fragmentos producidos recombinantemente, tales como fragmentos que comprenden disposiciones que no ocurren naturalmente, tales como aquellos con dos o más regiones o cadenas de anticuerpos unidas por enlazadores sintéticos, *p. ej.*, enlazadores peptídicos, y/o que no pueden ser producidos por digestión enzimática de un anticuerpo intacto que ocurre naturalmente. En algunas divulgaciones, los fragmentos de anticuerpo son scFvs.
- [0368]** Un anticuerpo "humanizado" es un anticuerpo en el que todos o sustancialmente todos los residuos de aminoácidos CDR se derivan de CDR no humanos y todos o sustancialmente todos los residuos de aminoácidos FR se derivan de FR humanos. Un anticuerpo humanizado puede incluir opcionalmente al menos una porción de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo no humano se refiere a una variante del anticuerpo no humano que ha sido humanizada, normalmente para reducir la inmunogenicidad en humanos, pero conservando la especificidad y afinidad del anticuerpo no humano parental. En algunas divulgaciones, algunos residuos FR en un anticuerpo humanizado se sustituyen por residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (*por ejemplo*, el anticuerpo del que derivan los residuos CDR), *por ejemplo*, para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.
- [0369]** Así, en algunas divulgaciones, el receptor de antígeno quimérico, incluidos los CAR similares a TCR, incluye una porción extracelular que contiene un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. En algunas divulgaciones, el anticuerpo o fragmento incluye un scFv. En algunas divulgaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede obtenerse por cribado de una pluralidad, tal como una biblioteca, de fragmentos o moléculas de unión a antígeno, tal como por cribado de una biblioteca scFv para la unión a un antígeno o ligando específico.
- [0370]** En algunas divulgaciones, el receptor recombinante, por ejemplo, un receptor de antígeno quimérico, incluye una porción extracelular que contiene uno o más dominios de unión a ligando (por ejemplo, antígeno), como un anticuerpo o fragmento del mismo, y una o más región o dominio de señalización intracelular (también denominado indistintamente dominio o región de señalización citoplasmática). En algunas divulgaciones, el receptor recombinante, por ejemplo, CAR, incluye además un espaciador y/o un dominio o porción transmembrana. En algunas divulgaciones, el espaciador y/o el dominio transmembrana pueden unir la porción extracelular que contiene el dominio de unión a ligando (*p. ej.*, antígeno) y la(s) región(es) o dominio(s) de señalización intracelular.

[0371] En algunas divulgaciones, la porción de anticuerpo del receptor recombinante, por ejemplo, CAR, incluye además al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina, tal como una región bisagra, por ejemplo, una región bisagra IgG4, y/o una región CH1/CL y/o Fc. En algunas divulgaciones, la región o porción constante es de una IgG humana, como IgG4 o IgG1. En algunas divulgaciones, la porción de la región constante sirve como región espaciadora entre el componente de reconocimiento de antígeno, por ejemplo, scFv, y el dominio transmembrana. El espaciador puede ser de una longitud que proporcione una mayor capacidad de respuesta de la célula tras la unión al antígeno, en comparación con la ausencia del espaciador. **[0262]** Entre los espaciadores ejemplares, *por ej.*, regiones de bisagra, se incluyen los descritos en la publicación de solicitud de patente internacional número WO2014031687. En algunas divulgaciones, el espaciador es o tiene aproximadamente 12 aminoácidos de longitud o no tiene más de 12 aminoácidos de longitud. Los espaciadores ejemplares incluyen los que tienen al menos entre 10 y 229 aminoácidos, entre 10 y 200 aminoácidos, entre 10 y 175 aminoácidos, entre 10 y 150 aminoácidos, entre 10 y 125 aminoácidos, entre 10 y 100 aminoácidos, entre 10 y 75 aminoácidos, entre 10 y 50 aminoácidos, entre 10 y 40 aminoácidos, entre 10 y 30 aminoácidos, entre 10 y 20 aminoácidos o entre 10 y 15 aminoácidos, e incluyen cualquier número entero entre los extremos de cualquiera de los intervalos enumerados. En algunas divulgaciones, una región espaciadora tiene unos 12 aminoácidos o menos, unos 119 aminoácidos o menos, o unos 229 aminoácidos o menos. En algunas divulgaciones, el espaciador tiene menos de 250 aminoácidos de longitud, menos de 200 aminoácidos de longitud, menos de 150 aminoácidos de longitud, menos de 100 aminoácidos de longitud, menos de 75 aminoácidos de longitud, menos de 50 aminoácidos de longitud, menos de 25 aminoácidos de longitud, menos de 20 aminoácidos de longitud, menos de 15 aminoácidos de longitud, menos de 12 aminoácidos de longitud o menos de 10 aminoácidos de longitud. En algunas divulgaciones, el espaciador es de o de aproximadamente 10 a 250 aminoácidos de longitud, 10 a 150 aminoácidos de longitud, 10 a 100 aminoácidos de longitud, 10 a 50 aminoácidos de longitud, 10 a 25 aminoácidos de longitud, 10 a 15 aminoácidos de longitud, 15 a 250 aminoácidos de longitud, 15 a 150 aminoácidos de longitud, 15 a 100 aminoácidos de longitud, 15 a 50 aminoácidos de longitud, 15 a 25 aminoácidos de longitud, 25 a 250 aminoácidos de longitud, 25 a 100 aminoácidos de longitud, 25 a 50 aminoácidos de longitud, 50 a 250 aminoácidos de longitud, 50 a 150 aminoácidos de longitud, 50 a 100 aminoácidos de longitud, 100 a 250 aminoácidos de longitud, 100 a 150 aminoácidos de longitud, o 150 a 250 aminoácidos de longitud. Los espaciadores ejemplares incluyen la bisagra IgG4 sola, la bisagra IgG4 unida a los dominios C_H2 y C_H3, o la bisagra CH2 unida al dominio C_H3. Los espaciadores ejemplares incluyen, entre otros, los descritos en Hudecek et al. Clin. Cancer Res., 19:3153 (2013), solicitud de patente internacional número de publicación WO2014031687, EE. UU. Patente nº 8.822.647 o aplicación publicada. Nº US2014/0271635.

[0372] En algunas divulgaciones, la región o porción constante es de una IgG humana, tal como IgG4 o IgG1. En algunas divulgaciones, el espaciador es un espaciador polipeptídico tal como uno o más seleccionados entre: (a) comprende o consiste en toda o una porción de una bisagra de inmunoglobulina o una versión modificada de la misma o comprende unos 15 aminoácidos o menos, y no comprende una región extracelular CD28 o una región extracelular CD8, (b) comprende o consiste en toda o una porción de una bisagra de inmunoglobulina, opcionalmente una bisagra IgG4 o una versión modificada de la misma y/o comprende unos 15 aminoácidos o menos, y no comprende una región extracelular CD28 o una región extracelular CD8, o (c) tiene una longitud igual o superior a 12 aminoácidos y/o comprende o consiste en la totalidad o una parte de una bisagra de inmunoglobulina, opcionalmente una IgG4, o una versión modificada de la misma; o (d) comprende o consiste en la fórmula X₁PPX₂P (SEQ ID N.º: 31), donde X₁ es glicina, cisteína o arginina y X₂ es cisteína o treonina. En algunas divulgaciones, el espaciador tiene la secuencia ESKYGPPCPPCP (establecida en SEQ ID N.º: 1), y está codificada por la secuencia establecida en SEQ ID N.º: 2. En algunas divulgaciones, el espaciador tiene la secuencia establecida en SEQ ID N.º: 3. En algunas divulgaciones, el espaciador tiene la secuencia establecida en SEQ ID N.º: 4. En algunas divulgaciones, la región o porción constante es de IgD. En algunas divulgaciones, el espaciador tiene la secuencia establecida en SEQ ID N.º: 5. En algunas divulgaciones, el espaciador tiene una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más identidad de secuencia con cualquiera de los SEQ ID N.º: 1, 3, 4 ó 5 ó 27-34.

[0373] Este dominio de reconocimiento de antígeno generalmente está unido a uno o más componentes de señalización intracelular, tales como componentes de señalización que imitan la activación a través de un complejo receptor de antígeno, tal como un complejo TCR, en el caso de un CAR, y/o señal a través de otro receptor de superficie celular. Así, en algunas divulgaciones, el componente de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpo) está unido a uno o más dominios de señalización transmembrana e intracelulares. En algunas divulgaciones, el dominio transmembrana está fusionado al dominio extracelular. En una divulgación, se utiliza un dominio transmembrana que naturalmente está asociado con uno de los dominios del receptor, por ejemplo, CAR. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio transmembrana se selecciona o modifica mediante sustitución de aminoácidos para evitar la unión de dichos dominios a los dominios transmembrana de las mismas o diferentes proteínas de membrana de superficie para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor.

[0374] En algunas divulgaciones, el dominio transmembrana se deriva de una fuente natural o sintética. Cuando la fuente es natural, en algunas divulgaciones el dominio se deriva de cualquier proteína de membrana o transmembrana. Las regiones transmembrana incluyen las derivadas de (es decir, que comprenden al menos la(s) región(es) transmembrana de) la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD 16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137(4-1BB), CD 154. Alternativamente, el dominio transmembrana en algunas divulgaciones es sintético. En algunas divulgaciones, el dominio transmembrana sintético comprende residuos predominantemente hidrofóbicos como leucina y valina. En algunas divulgaciones, se encontrará un triplete de fenilalanina, triptófano y valina en cada extremo de un dominio transmembrana sintético. En algunas divulgaciones, la

unión se realiza mediante enlazadores, espaciadores y/o dominio(s) transmembrana. En algunas divulgaciones, el dominio transmembrana contiene una porción transmembrana de CD28 o una variante de la misma. El dominio extracelular y el transmembrana pueden estar unidos directa o indirectamente. En algunas divulgaciones, el dominio extracelular y el transmembrana están unidos por un espaciador, como cualquiera de los descritos en el presente documento.

[0375] Entre los dominios de señalización intracelular se encuentran aquellos que imitan o aproximan una señal a través de un receptor de antígeno natural, una señal a través de dicho receptor en combinación con un receptor costimulador, y/o una señal a través de un receptor costimulador solo. En algunas divulgaciones, está presente un enlazador oligopéptido corto, por ejemplo, un enlazador de entre 2 y 10 aminoácidos de longitud, como uno que contenga glicinas y serinas, por ejemplo, un doblete glicina-serina, y forma un enlace entre el dominio transmembrana y el dominio de señalización citoplasmática del CAR.

[0376] El receptor, por ejemplo, el CAR, generalmente incluye al menos un componente o componentes de señalización intracelular. En algunas divulgaciones, el receptor incluye un componente intracelular de un complejo TCR, como una cadena TCR CD3 que media la activación de células T y la citotoxicidad, por ejemplo, la cadena CD3 zeta. Así, en algunas divulgaciones, la porción de unión al antígeno está unida a uno o más módulos de señalización celular. En algunas divulgaciones, los módulos de señalización celular incluyen dominio transmembrana CD3, dominios de señalización intracelular CD3 y/u otros dominios transmembrana CD. En algunas divulgaciones, el receptor, por ejemplo, CAR, incluye además una porción de una o más moléculas adicionales como el receptor Fc γ , CD8, CD4, CD25 o CD16. Por ejemplo, en algunas divulgaciones, el CAR u otro receptor quimérico incluye una molécula quimérica entre CD3-zeta (CD3- ζ) o el receptor Fc γ y CD8, CD4, CD25 o CD16.

[0377] En algunas divulgaciones, tras la ligadura del CAR u otro receptor quimérico, el dominio citoplasmático o dominio de señalización intracelular del receptor activa al menos una de las funciones efectoras normales o respuestas de la célula inmune, por ejemplo, célula T diseñada para expresar el CAR. Por ejemplo, en algunos contextos, el CAR induce una función de una célula T, como la actividad citolítica o la actividad T-auxiliar, como la secreción de citocinas u otros factores. En algunas divulgaciones, se utiliza una porción truncada de un dominio de señalización intracelular de un componente receptor de antígeno o molécula coestimuladora en lugar de una cadena inmunoestimuladora intacta, por ejemplo, si transduce la señal de función efectora. En algunas divulgaciones, el dominio o dominios de señalización intracelular incluyen las secuencias citoplásmicas del receptor de células T (TCR), y en algunas divulgaciones también las de correceptores que en el contexto natural actúan en concierto con tales receptores para iniciar la transducción de señales tras el enganche del receptor de antígeno.

[0378] En el contexto de un TCR natural, la activación completa generalmente requiere no sólo la señalización a través del TCR, sino también una señal coestimuladora.

[0379] Así, en algunas divulgaciones, para promover la activación completa, también se incluye en el CAR un componente para generar una señal secundaria o coestimuladora. En otras divulgaciones, el CAR no incluye un componente para generar una señal costimuladora. En algunas divulgaciones, un CAR adicional se expresa en la misma célula y proporciona el componente para generar la señal secundaria o costimuladora.

[0380] En algunas divulgaciones se describe la activación de células T 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 citoplasmática primaria), y las que actúan de manera independiente de antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora (secuencias de señalización citoplasmática secundaria). En algunas divulgaciones, el CAR incluye uno o ambos componentes de señalización.

[0381] En algunas divulgaciones, el CAR incluye una secuencia de señalización citoplasmática primaria que regula la activación primaria del complejo TCR. Las secuencias de señalización citoplasmática primaria que actúan de forma estimuladora pueden contener motivos de señalización que se conocen como motivos de activación basados en tirosinas inmunorreceptoras o ITAM. Ejemplos de ITAM que contienen secuencias de señalización citoplasmáticas primarias incluyen las derivadas de TCR zeta, FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD8, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. En algunas divulgaciones, la(s) molécula(s) de señalización citoplasmática en la CAR contiene(n) un dominio de señalización citoplasmática, una porción del mismo o una secuencia derivada de CD3 zeta.

[0382] En algunas divulgaciones, el CAR incluye un dominio de señalización y/o una porción transmembrana de un receptor costimulador, como CD28, 4-1BB, OX40, DAP10 e ICOS. En algunas divulgaciones, el mismo CAR incluye tanto los componentes activadores como los coestimuladores.

[0383] En algunas divulgaciones, el dominio activador está incluido en un CAR, mientras que el componente coestimulador es proporcionado por otro CAR que reconoce otro antígeno. En algunas divulgaciones, los CAR incluyen CAR activadores o estimuladores, CAR costimuladores, ambos expresados en la misma célula (véase WO2014/055668). En algunas divulgaciones, las células incluyen uno o más CAR estimuladores o activadores y/o un CAR coestimulador. En algunas divulgaciones, las células incluyen además CAR inhibitorias (iCAR, véase Fedorov et al., Sci. Transl. Medicine, 5(215) (2013), como un CAR que reconoce un antígeno distinto del asociado y/o específico de la enfermedad o afección,

mediante el cual una señal activadora emitida a través del CAR de marcación de la enfermedad se ve disminuida o inhibida por la unión del CAR inhibidor a su ligando, *por ej.*, para reducir los efectos fuera de diana.

[0384] En ciertas divulgaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio transmembrana y de señalización CD28 unido a un dominio intracelular CD3 (por ejemplo, CD3-zeta). En algunas divulgaciones, el dominio de señalización intracelular comprende unos dominios coestimuladores quiméricos CD28 y CD137 (4-1BB, TNFRSF9), unidos a un dominio intracelular CD3 zeta.

[0385] En algunas divulgaciones, el CAR abarca uno o más, por ejemplo, dos o más, dominios costimulatorios y un dominio de activación, por ejemplo, dominio de activación primario, en la porción citoplasmática. Los CAR ejemplares incluyen componentes intracelulares de CD3-zeta, CD28 y 4-1BB.

[0386] En algunas divulgaciones, el CAR u otro receptor de antígeno incluye además un marcador, tal como un marcador de superficie celular, que puede usarse para confirmar la transducción o ingeniería de la célula para expresar el receptor, tal como una versión truncada de un receptor de superficie celular, tal como EGFR truncado (tEGFR). En algunas divulgaciones, el marcador incluye todo o parte (por ejemplo, forma truncada) de CD34, un NGFR o receptor del factor de crecimiento epidérmico (por ejemplo, tEGFR). En algunas divulgaciones, el ácido nucleico que codifica el marcador está enlazado operablemente a un polinucleótido que codifica para una secuencia enlazadora, tal como una secuencia enlazadora escindible, por ejemplo, T2A. Por ejemplo, un marcador, y opcionalmente una secuencia enlazadora, puede ser cualquiera de los descritos en la solicitud de patente publicada nº WO2014031687. Por ejemplo, el marcador puede ser un EGFR truncado (tEGFR) que está, opcionalmente, unido a una secuencia enlazadora, tal como una secuencia enlazadora T2A escindible. Un polipéptido ejemplar para un EGFR truncado (*por ej.*, tEGFR) comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID Nº: 7 ó 23, o una secuencia de aminoácidos que presente al menos un 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con SEQ ID Nº: 7, o 23. Una secuencia enlazadora T2A ejemplar comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID Nº: 6 o una secuencia de aminoácidos que presente al menos un 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con SEQ ID Nº: 6.

[0387] En algunas divulgaciones, el marcador es una molécula, por ejemplo, proteína de superficie celular, que no se encuentra naturalmente en las células T o que no se encuentra naturalmente en la superficie de las células T, o una porción de la misma. En algunas divulgaciones, la molécula es una molécula no propia, por ejemplo, una proteína no propia, es decir, una que no es reconocida como "propia" por el sistema inmunitario del huésped al que se transferirán adoptivamente las células.

[0388] En algunas divulgaciones, el marcador no tiene ninguna función terapéutica y/o no produce ningún efecto aparte de ser utilizado como marcador para la ingeniería genética, por ejemplo, para seleccionar células manipuladas con éxito. En otras divulgaciones, el marcador puede ser una molécula terapéutica o una molécula que ejerza algún efecto deseado, como un ligando para una célula que se va a encontrar in vivo, como una molécula coestimuladora o de punto de control inmunitario para mejorar y/o amortiguar las respuestas de las células tras la transferencia adoptiva y el encuentro con el ligando.

[0389] En algunos casos, los CARs se denominan CARs de primera, segunda, tercera o cuarta generación. En algunas divulgaciones, un CAR de primera generación es aquel que únicamente proporciona una señal de estimulación o activación primaria, por ejemplo, a través de una señal inducida por la cadena CD3 tras la unión al antígeno; en algunas divulgaciones, un CAR de segunda generación es aquel que proporciona tal señal y señal costimuladora, tal como uno que incluye una(s) región(es) o dominio(s) de señalización intracelular de uno o más receptores costimuladores tales como CD28, CD137 (4-1BB), OX40 (CD134), CD27, DAP10, DAP12, NKG2D, ICOS y/u otros receptores costimuladores; en algunas divulgaciones, un CAR de tercera generación es aquel que incluye múltiples dominios costimuladores de diferentes receptores costimuladores, por ejemplo, seleccionados de CD28, CD137 (4-1BB), OX40 (CD134), CD27, DAP10, DAP12, NKG2D, ICOS y/u otros receptores costimuladores; en algunas divulgaciones, un CAR de cuarta generación es uno que incluye tres o más dominios costimuladores de diferentes receptores costimuladores, por ejemplo, seleccionados entre CD28, CD137 (4-1BB), OX40 (CD134), CD27, DAP10, DAP12, NKG2D, ICOS y/u otros receptores costimuladores.

[0390] En algunas divulgaciones, el receptor de antígeno quimérico incluye una porción extracelular que contiene un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. En algunas divulgaciones, el receptor de antígeno quimérico incluye una porción extracelular que contiene el anticuerpo o fragmento y un dominio de señalización intracelular. En algunas divulgaciones, el anticuerpo o fragmento incluye un scFv y el dominio intracelular contiene un ITAM. En algunas divulgaciones, el dominio de señalización intracelular incluye un dominio de señalización de una cadena zeta de una cadena CD3-zeta (CD3ζ). En algunas divulgaciones, el receptor de antígeno quimérico incluye un dominio transmembrana que une el dominio extracelular y el dominio de señalización intracelular. En algunas divulgaciones, el dominio transmembrana contiene una porción transmembrana de CD28. En algunas divulgaciones, el receptor de antígeno quimérico contiene un dominio intracelular de una molécula coestimuladora de células T. La porción de unión al antígeno del dominio extracelular y el dominio transmembrana pueden estar unidos directa o indirectamente. En algunas divulgaciones, la porción de unión a antígeno del dominio extracelular y el dominio transmembrana están unidos por un espaciador, tal como cualquiera descrito en el presente documento. En algunas divulgaciones, el receptor contiene una porción extracelular de la molécula

de la que deriva el dominio transmembrana, como una porción extracelular CD28. En algunas divulgaciones, el receptor de antígeno quimérico contiene un dominio intracelular derivado de una molécula coestimuladora de células T o una variante funcional de la misma, tal como entre el dominio transmembrana y el dominio de señalización que contiene ITAM, por ejemplo, derivado de CD3zeta. En algunas divulgaciones, la molécula coestimuladora de células T es CD28 o 41BB.

[0391] Por ejemplo, en algunas divulgaciones, el CAR contiene un anticuerpo, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo, un dominio transmembrana que es o contiene una porción transmembrana de CD28 o una variante funcional del mismo, y un dominio de señalización intracelular que contiene una porción de señalización de CD28 o una variante funcional del mismo y una porción de señalización de CD3 zeta o una variante funcional del mismo. En algunas divulgaciones, el CAR contiene un anticuerpo, *por ej., un* fragmento de anticuerpo, un dominio transmembrana que es o contiene una porción transmembrana de CD28 o una variante funcional del mismo, y un dominio de señalización intracelular que contiene una porción de señalización de un 4-1BB o una variante funcional del mismo y una porción de señalización de CD3 zeta o una variante funcional del mismo. En algunas de dichas divulgaciones, el receptor incluye además un espaciador que contiene una porción de una molécula de Ig, tal como una molécula de Ig humana, tal como una bisagra de Ig o variante de la misma, por ejemplo una bisagra de IgG4 o variante de la misma, tal como un espaciador de sólo bisagra.

[0392] En algunas divulgaciones, el dominio transmembrana del receptor recombinante, por ejemplo, el CAR, es o incluye un dominio transmembrana de CD28 humano (por ejemplo, N° de acceso P10747.1) o una variante del mismo, como un dominio transmembrana que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID N.º: 8, o una secuencia de aminoácidos que presente al menos un 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con SEQ ID N.º: 8; en algunas divulgaciones, la porción del receptor recombinante que contiene el dominio transmembrana comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID N.º: 9 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con la misma.

[0393] En algunas divulgaciones, el componente o componentes de señalización intracelular del receptor recombinante, por ejemplo el CAR, contiene un dominio de señalización costimuladora intracelular de CD28 humano o una variante funcional o porción del mismo, tal como un dominio con una sustitución LL a GG en las posiciones 186-187 de una proteína CD28 nativa. Por ejemplo, el dominio de señalización intracelular puede comprender la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID N.º: 10 u 11 o una secuencia de aminoácidos que presente al menos un 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con SEQ ID N.º: 10, o 11. En algunas divulgaciones, el dominio intracelular comprende un dominio de señalización costimuladora intracelular de 4-1BB (p. ej., Q07011.1) o una variante funcional o parte de la misma, como la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID N.º: 12 o una secuencia de aminoácidos que presente al menos un 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con SEQ ID N.º: 12.

[0394] En algunas divulgaciones, el dominio de señalización intracelular del receptor recombinante, por ejemplo el CAR, comprende un dominio de señalización estimulador CD3 zeta humano o una variante funcional del mismo, tal como un dominio citoplasmático 112 AA de la isoforma 3 de CD3ζ humano (N° de acceso: P20963.2) o un dominio de señalización CD3 zeta como se describe en la Patente de EEUU N.º: 7.446.190 o EE.UU. Patente de EEUU N.º 8.911.993. Por ejemplo, en algunas divulgaciones, el dominio de señalización intracelular comprende la secuencia de aminoácidos según se establece en SEQ ID N.º: 13, 14 ó 15 o una secuencia de aminoácidos que presente al menos un 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con SEQ ID N.º: 13, 14, o 15.

[0395] En algunas divulgaciones, el espaciador contiene sólo una región bisagra de una IgG, tal como sólo una bisagra de IgG4 o IgG1, tal como el espaciador sólo bisagra establecido en SEQ ID N.º: 1. En otras divulgaciones, el espaciador es o contiene una bisagra Ig, por ejemplo, una bisagra derivada de IgG4, opcionalmente unida a un dominio CH2 y/o CH3. En algunas divulgaciones, el espaciador es una bisagra Ig, por ejemplo, una bisagra IgG4, unida a los dominios CH2 y CH3, tal como se establece en SEQ ID N.º: 4. En algunas divulgaciones, el espaciador es una bisagra Ig, por ejemplo, una bisagra IgG4, unida únicamente a un dominio CH3, tal como se establece en SEQ ID N.º: 3. En algunas divulgaciones, el espaciador es o comprende una secuencia rica en glicina-serina u otro enlazador flexible como los enlazadores flexibles conocidos.

[0396] Por ejemplo, en algunas divulgaciones, el CAR incluye un anticuerpo tal como un fragmento de anticuerpo, incluyendo scFvs, un espaciador, tal como un espaciador que contiene una porción de una molécula de inmunoglobulina, tal como una región bisagra y/o una o más regiones constantes de una molécula de cadena pesada, como un espaciador que contenga una bisagra Ig, un dominio transmembrana que contenga todo o parte de un dominio transmembrana derivado de CD28, un dominio de señalización intracelular derivado de CD28 y un dominio de señalización CD3 zeta. En algunas divulgaciones, el CAR incluye un anticuerpo o fragmento, como scFv, un espaciador como cualquiera de los espaciadores que contienen Ig-hinge, un dominio transmembrana derivado de CD28, un dominio de señalización intracelular derivado de 4-1BB y un dominio de señalización derivado de CD3 zeta.

[0397] En algunas divulgaciones, las moléculas de ácido nucleico que codifican tales construcciones CAR incluyen además una secuencia que codifica un elemento de salto ribosomal T2A y/o una secuencia tEGFR, por ejemplo, corriente abajo de la secuencia que codifica el CAR. En algunas divulgaciones, la secuencia codifica un elemento de salto

ribosómico T2A establecido en SEQ ID N.º 6, o una secuencia de aminoácidos que presente al menos un 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con SEQ ID N.º 6. En algunas divulgaciones, las células T que expresan un receptor de antígeno (por ejemplo, CAR) también pueden generarse para expresar un EGFR truncado (EGFRt) como epítipo de selección no inmunogénico (por ejemplo, mediante la introducción de una construcción que codifica el CAR y el EGFRt separados por un conmutador ribosómico T2A para expresar dos proteínas de la misma construcción), que luego puede utilizarse como marcador para detectar dichas células (véase, por ejemplo, U.S. Patente de EEUU N.º 8.802.374. En algunas divulgaciones, la secuencia codifica una secuencia tEGFR establecida en SEQ ID N.º: 7 ó 23, o una secuencia de aminoácidos que presente al menos un 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con SEQ ID N.º: 7, o 23.

[0398] Los receptores recombinantes, tales como CARs, expresados por las células administradas al sujeto generalmente reconocen o se unen específicamente a una molécula que se expresa en, está asociada con, y/o es específica para la enfermedad o condición o células de la misma que están siendo tratadas. Tras la unión específica a la molécula, *por ej., el* antígeno, el receptor generalmente envía una señal inmunoestimuladora, como una señal inducida por ITAM, a la célula, promoviendo así una respuesta inmunitaria dirigida a la enfermedad o afección. Por ejemplo, en algunas divulgaciones, las células expresan un CAR que se une específicamente a un antígeno expresado por una célula o tejido de la enfermedad o afección o asociado con la enfermedad o afección.

B. TCR

[0399] En algunas divulgaciones, se divulgan células de ingeniería, tales como células T, que expresan un receptor de células T (TCR) o una porción de unión a antígeno del mismo que reconoce un epítipo peptídico o epítipo de células T de un polipéptido diana, tal como un antígeno de una proteína tumoral, viral o autoinmune.

[0400] En algunas divulgaciones, un "receptor de células T" o "TCR" es una molécula que contiene cadenas α y β variables (también conocidas como TCR α y TCR β , respectivamente) o cadenas γ y δ variables (también conocidas como TCR γ y TCR δ , respectivamente), o porciones de unión a antígeno de las mismas, y que es capaz de unirse específicamente a un péptido unido a una molécula MHC. En algunas divulgaciones, el TCR está en la forma $\alpha\beta$. Normalmente, los TCR que existen en las formas $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ suelen ser estructuralmente similares, pero las células T que los expresan pueden tener ubicaciones anatómicas o funciones distintas. Un TCR puede encontrarse en la superficie de una célula o en forma soluble. Por lo general, un TCR se encuentra en la superficie de las células T (o células T), donde suele encargarse de reconocer antígenos unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH).

[0401] A menos que se indique lo contrario, debe entenderse que el término "TCR" abarca los TCR completos así como porciones de unión a antígeno o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. En algunas divulgaciones, el TCR es un TCR intacto o de longitud completa, incluidos los TCR en forma $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$. En algunas divulgaciones, el TCR es una porción de unión a antígeno que es menor que un TCR de longitud completa pero que se une a un péptido específico unido en una molécula MHC, como se une a un complejo MHC-péptido. En algunos casos, una porción o fragmento de unión a antígeno de un TCR puede contener sólo una parte de los dominios estructurales de un TCR completo o intacto, pero aun así es capaz de unirse al epítipo peptídico, como el complejo MHC-péptido, al que se une el TCR completo. En algunos casos, una porción de unión a antígeno contiene los dominios variables de un TCR, como la cadena α variable y la cadena β variable de un TCR, suficientes para formar un sitio de unión para unirse a un complejo MHC-péptido específico. Generalmente, las cadenas variables de un TCR contienen regiones determinantes de la complementariedad que intervienen en el reconocimiento del péptido, MHC y/o complejo MHC-péptido.

[0402] En algunas divulgaciones, los dominios variables del TCR contienen bucles hipervariables, o regiones determinantes de la complementariedad (CDR), que generalmente son los principales contribuyentes al reconocimiento del antígeno y a las capacidades y especificidad de unión. En algunas divulgaciones, una CDR de un TCR o una combinación de las mismas forma todo o sustancialmente todo el sitio de unión a antígeno de una molécula de TCR dada. Las distintas CDRs dentro de una región variable de una cadena TCR generalmente están separadas por regiones base (FR), que generalmente muestran menos variabilidad entre las moléculas TCR en comparación con las CDRs (véase, *por ej.*, Jores et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 87:9138, 1990; Chothia et al., EMBO J. 7:3745, 1988; véase también Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27:55, 2003). En algunas divulgaciones, la CDR3 es la principal CDR responsable de la unión al antígeno o de la especificidad, o es la más importante entre las tres CDR de una región variable del TCR dada para el reconocimiento del antígeno, y/o para la interacción con la porción peptídica procesada del complejo péptido-MHC. En algunos contextos, la CDR1 de la cadena alfa puede interactuar con la parte N-terminal de ciertos péptidos antigénicos. En algunos contextos, la CDR1 de la cadena beta puede interactuar con la parte C-terminal del péptido. En algunos contextos, la CDR2 contribuye en mayor medida o es la CDR principal responsable de la interacción o el reconocimiento de la porción MHC del complejo MHC-péptido. En algunas divulgaciones, la región variable de la cadena β puede contener otra región hipervariable (CDR4 o HVR4), que generalmente está implicada en la unión del superantígeno y no en el reconocimiento del antígeno (Kotb (1995) Clinical Microbiology Reviews, 8:411-426).

[0403] En algunas divulgaciones, un TCR también puede contener un dominio constante, un dominio transmembrana y/o una cola citoplasmática corta (véase, p. ej., Janeway et al., Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 3ª edición, Current Biology Publications, p. 4:33, 1997). En algunas divulgaciones, cada cadena del TCR puede poseer

un dominio variable de inmunoglobulina N-terminal, un dominio constante de inmunoglobulina, una región transmembrana y una cola citoplasmática corta en el extremo C-terminal. En algunas divulgaciones, un TCR se asocia con proteínas invariantes del complejo CD3 implicadas en la mediación de la transducción de señales.

5 **[0404]** En algunas divulgaciones, una cadena TCR contiene uno o más dominios constantes. Por ejemplo, la porción extracelular de una cadena TCR dada (*por ej.*, cadena α o cadena β) puede contener dos dominios similares a inmunoglobulinas, como un dominio variable (*por ej.*, $V\alpha$ o $V\beta$; normalmente aminoácidos 1 a 116 basados en la numeración de Kabat Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 5ª ed.) y un dominio constante (*por ej.*, dominio constante de cadena α o $C\alpha$, típicamente posiciones 117 a 259 de la cadena según la numeración de Kabat o dominio constante de cadena β o $C\beta$, típicamente posiciones 117 a 295 de la cadena según Kabat) adyacente a la membrana celular. Por ejemplo, en algunos casos, la porción extracelular del TCR formada por las dos cadenas contiene dos dominios constantes proximales de membrana y dos dominios variables distales de membrana, cada uno de los cuales contiene CDR. El dominio constante del TCR puede contener secuencias de conexión cortas en las que un residuo de cisteína forma un enlace disulfuro, uniendo así las dos cadenas del TCR. En algunas divulgaciones, un TCR puede tener un residuo de cisteína adicional en cada una de las cadenas α y β , de manera que el TCR contiene dos enlaces disulfuro en los dominios constantes.

20 **[0405]** En algunas divulgaciones, las cadenas TCR contienen un dominio transmembrana. En algunas divulgaciones, el dominio transmembrana está cargado positivamente. En algunos casos, la cadena del TCR contiene una cola citoplasmática. En algunos casos, la estructura permite que el TCR se asocie con otras moléculas como CD3 y sus subunidades. Por ejemplo, un TCR que contenga dominios constantes con una región transmembrana puede anclar la proteína en la membrana celular y asociarse con subunidades invariantes del aparato o complejo de señalización CD3. Las colas intracelulares de las subunidades de señalización CD3 (*por ejemplo*, las cadenas $CD3\gamma$, $CD3\delta$, $CD3\epsilon$ y $CD3\zeta$) contienen uno o más motivos de activación basados en tirosinas inmunorreceptoras o ITAM que intervienen en la capacidad de señalización del complejo TCR.

30 **[0406]** En algunas divulgaciones, el TCR puede ser un heterodímero de dos cadenas α y β (u opcionalmente γ y δ) o puede ser una construcción de TCR de cadena única. En algunas divulgaciones, el TCR es un heterodímero que contiene dos cadenas separadas (cadenas α y β o cadenas γ y δ) que están unidas, como por un enlace disulfuro o enlaces disulfuro.

35 **[0407]** En algunas divulgaciones, el TCR puede generarse a partir de una(s) secuencia(s) de TCR conocida(s), como secuencias de cadenas $V\alpha, \beta$, para las que se dispone fácilmente de una secuencia codificante de longitud sustancialmente completa. Los métodos para obtener secuencias de TCR de longitud completa, incluidas las secuencias de la cadena V , a partir de fuentes celulares son bien conocidos. En algunas divulgaciones, los ácidos nucleicos que codifican el TCR pueden obtenerse de diversas fuentes, como por amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de ácidos nucleicos que codifican el TCR dentro o aislados de una célula o células dadas, o síntesis de secuencias de ADN de TCR disponibles públicamente.

40 **[0408]** En algunas divulgaciones, el TCR se obtiene de una fuente biológica, tal como de células tales como de una célula T (*por ejemplo*, célula T citotóxica), hibridomas de células T u otra fuente disponible públicamente. En algunas divulgaciones, las células T pueden obtenerse a partir de células aisladas *in vivo*. En algunas divulgaciones, el TCR es un TCR seleccionado típicamente. En algunas divulgaciones, el TCR es un TCR restringido a neoepítopos. En algunas divulgaciones, las células T pueden ser un hibridoma o clon de células T cultivadas. En algunas divulgaciones, el TCR o la porción de unión a antígeno del mismo puede generarse sintéticamente a partir del conocimiento de la secuencia del TCR.

50 **[0409]** En algunas divulgaciones, el TCR se genera a partir de un TCR identificado o seleccionado a partir del cribado de una biblioteca de TCR candidatos contra un antígeno polipéptido diana, o un epítipo de células T diana del mismo. Las bibliotecas de TCR pueden generarse por amplificación del repertorio de $V\alpha$ y $V\beta$ de células T aisladas de un sujeto, incluidas las células presentes en PBMC, bazo u otro órgano linfóide. En algunos casos, las células T pueden amplificarse a partir de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL). En algunas divulgaciones, las bibliotecas de TCR pueden generarse a partir de células $CD4^+$ o $CD8^+$. En algunas divulgaciones, los TCR pueden amplificarse a partir de una fuente de células T de un sujeto normal o sano, es *decir*, bibliotecas de TCR normales. En algunas divulgaciones, los TCR pueden amplificarse a partir de una fuente de células T de un sujeto enfermo, es *decir*, bibliotecas de TCR enfermos. En algunas divulgaciones, se utilizan cebadores degenerados para amplificar el repertorio génico de $V\alpha$ y $V\beta$, como por RT-PCR en muestras, como células T, obtenidas de seres humanos. En algunas divulgaciones, las bibliotecas scTv pueden ensamblarse a partir de bibliotecas $V\alpha$ y $V\beta$ ingenuas en las que los productos amplificados se clonan o ensamblan para separarse mediante un enlazador. Dependiendo del origen del sujeto y de las células, las bibliotecas pueden ser específicas para cada alelo HLA. Alternativamente, en algunas divulgaciones, las bibliotecas de TCR pueden generarse por mutagénesis o diversificación de una molécula de TCR madre o andamiaje. En algunas divulgaciones, los TCR se someten a evolución dirigida, como por mutagénesis, *por ej.*, de la cadena α o β . En algunas divulgaciones, se alteran residuos particulares dentro de las CDR del TCR. En algunas divulgaciones, los TCR seleccionados pueden modificarse mediante maduración por afinidad. En algunas divulgaciones, pueden seleccionarse células T específicas de antígeno, como por ejemplo mediante cribado para evaluar la actividad CTL contra el péptido. En algunas divulgaciones, los TCR,

p. ej. presentes en las células T específicas de antígeno, pueden seleccionarse, como por actividad de unión, p. ej., afinidad o aversez particular por el antígeno.

[0410] En algunas divulgaciones, el TCR o la porción de unión a antígeno del mismo es uno que ha sido modificado o manipulado. En algunas divulgaciones, se utilizan métodos de evolución dirigida para generar TCR con propiedades alteradas, como por ejemplo con mayor afinidad por un complejo MHC-péptido específico. En algunas divulgaciones, la evolución dirigida se consigue mediante métodos de visualización que incluyen, entre otros, la visualización en levadura (Holler et al. (2003) *Nat Immunol*, 4, 55-62; Holler et al. (2000) *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 5387-92), expresión en fago (Li et al. (2005) *Nat Biotechnol*, 23, 349-54), o expresión de células T (Chervin et al. (2008) *J Immunol Methods*, 339, 175-84). En algunas divulgaciones, los enfoques de visualización implican la ingeniería, o modificación, de un TCR conocido, parental o de referencia. Por ejemplo, en algunos casos, se puede utilizar un TCR de tipo salvaje como plantilla para producir TCR mutagenizados en los que se mutan uno o más residuos de las CDR, y se seleccionan mutantes con una propiedad alterada deseada, como una mayor afinidad por un antígeno diana deseado.

[0411] En algunas divulgaciones, los péptidos de un polipéptido diana para su uso en la producción o generación de un TCR de interés son conocidos o pueden ser fácilmente identificados por un artesano experto. En algunas divulgaciones, los péptidos adecuados para su uso en la generación de TCR o porciones de unión a antígeno pueden determinarse basándose en la presencia de un motivo restringido por HLA en un polipéptido diana de interés, tal como un polipéptido diana descrito a continuación. En algunas divulgaciones, los péptidos se identifican utilizando modelos informáticos de predicción conocidos por los expertos en la materia. En algunas divulgaciones, para predecir los sitios de unión del MHC de clase I, dichos modelos incluyen, entre otros, ProPred1 (Singh y Raghava (2001) *Bioinformatics* 17(12):1236-1237, y SYFPEITHI (véase Schuler et al. (2007) *Immunoinformatics Methods in Molecular Biology*, 409(1): 75-93 2007). En algunas divulgaciones, el epítipo restringido por MHC es HLA-A0201, que se expresa en aproximadamente el 39-46% de todos los caucásicos y, por lo tanto, representa una elección adecuada de antígeno MHC para su uso en la preparación de un TCR u otra molécula de unión a péptido MHC.

[0412] Los motivos de unión a HLA-A0201 y los sitios de escisión para proteasomas e inmunoproteasomas utilizando modelos de predicción por ordenador son conocidos por los expertos en la materia. Para predecir los sitios de unión del MHC de clase I, dichos modelos incluyen, entre otros, ProPred1 (descrito con más detalle en Singh y Raghava, ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. *BIOINFORMATICS* 17(12):1236-1237 2001), y SYFPEITHI (véase Schuler et al. SYFPEITHI, Database for Searching and T-Cell Epitope Prediction. en *Immunoinformatics Methods in Molecular Biology*, vol 409(1): 75-93 2007)

[0413] En algunas divulgaciones, el TCR o la porción de unión a antígeno del mismo puede ser una proteína natural producida recombinantemente o una forma mutada de la misma en la que una o más propiedades, como la característica de unión, han sido alteradas. En algunas divulgaciones, un TCR puede derivarse de una de varias especies animales, como el ser humano, el ratón, la rata u otro mamífero. Un TCR puede estar unido a la célula o en forma soluble. En algunas divulgaciones, para los fines de los métodos divulgados, el TCR está en forma unida a la célula expresada en la superficie de una célula.

[0414] En algunas divulgaciones, el TCR es un TCR de longitud completa. En algunas divulgaciones, el TCR es una porción de unión a antígeno. En algunas divulgaciones, el TCR es un TCR dimérico (dTCR). En algunas divulgaciones, el TCR es un TCR de cadena única (sc-TCR). En algunas divulgaciones, un dTCR o un scTCR tienen las estructuras descritas en WO 03/020763, WO 04/033685, WO2011/044186.

[0415] En algunas divulgaciones, el TCR contiene una secuencia correspondiente a la secuencia transmembrana. En algunas divulgaciones, el TCR sí contiene una secuencia correspondiente a secuencias citoplasmáticas. En algunas divulgaciones, el TCR es capaz de formar un complejo TCR con CD3. En algunas divulgaciones, cualquiera de los TCR, incluyendo un dTCR o scTCR, puede unirse a dominios de señalización que producen un TCR activo en la superficie de una célula T. En algunas divulgaciones, el TCR se expresa en la superficie de las células.

[0416] En algunas divulgaciones, un dTCR contiene un primer polipéptido en el que una secuencia correspondiente a una secuencia de región variable de cadena α del TCR se fusiona con el extremo N de una secuencia correspondiente a una secuencia extracelular de región constante de cadena α del TCR, y un segundo polipéptido en el que una secuencia correspondiente a una secuencia de región variable de cadena β del TCR se fusiona con el extremo N de una secuencia correspondiente a una secuencia extracelular de región constante de cadena β del TCR, estando el primer y segundo polipéptidos unidos por un enlace disulfuro. En algunas divulgaciones, el enlace puede corresponder al enlace disulfuro nativo entre cadenas presente en los TCR $\alpha\beta$ diméricos nativos. En algunas divulgaciones, los enlaces disulfuro entre cadenas no están presentes en un TCR nativo. Por ejemplo, en algunas divulgaciones, pueden incorporarse una o más cisteínas en las secuencias extracelulares de región constante del par de polipéptidos dTCR. En algunos casos, puede ser deseable tanto un enlace disulfuro nativo como uno no nativo. En algunas divulgaciones, el TCR contiene una secuencia transmembrana para anclarse a la membrana.

[0417] En algunas divulgaciones, un dTCR contiene una cadena TCR α que comprende un dominio α variable, un dominio α constante y un primer motivo de dimerización unido al C-terminal del dominio α constante, y una cadena TCR β que comprende un dominio β variable, un dominio β constante y un primer motivo de dimerización unido al C-terminal del

dominio β constante, en el que el primer y segundo motivos de dimerización interactúan fácilmente para formar un enlace covalente entre un aminoácido en el primer motivo de dimerización y un aminoácido en el segundo motivo de dimerización que une la cadena TCR α y la cadena TCR β .

[0418] En algunas divulgaciones, el TCR es un scTCR. Normalmente, una scTCR puede generarse utilizando métodos conocidos por los expertos en la materia, véase, por ejemplo, Soo Hoo, W. F. et al. PNAS (USA) 89, 4759 (1992); Wülfing, C. and Plückthun, A., J. Mol. Biol. 242, 655 (1994); Kurucz, I. et al. PNAS (EE.UU.) 90 3830 (1993); PCT internacional publicado N°. WO 96/13593, WO 96/18105, WO99/60120, WO99/18129, WO 03/020763, WO2011/044186; y Schlueter, C. J. et al. J. Mol. Biol. 256, 859 (1996). En algunas divulgaciones, un scTCR contiene un enlace disulfuro entre cadenas no nativo introducido para facilitar la asociación de las cadenas del TCR (véase, por ejemplo, la publicación internacional PCT N° WO 03/020763). En algunas divulgaciones, un scTCR es un TCR truncado no unido a disulfuro en el que cremalleras de leucina heterólogas fusionadas a los terminales C del mismo facilitan la asociación en cadena (véase, por ejemplo, el PCT internacional publicado n° WO99/60120). En algunas divulgaciones, un scTCR contiene un dominio variable TCR α unido covalentemente a un dominio variable TCR β mediante un enlazador peptídico (véase, por ejemplo, el PCT internacional publicado N° WO99/18129).

[0419] En algunas divulgaciones, un scTCR contiene un primer segmento constituido por una secuencia de aminoácidos correspondiente a una región variable de cadena α del TCR, un segundo segmento constituido por una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia de región variable de cadena β del TCR fusionada al extremo N de una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia extracelular de dominio constante de cadena β del TCR, y una secuencia enlazadora que une el extremo C del primer segmento al extremo N del segundo segmento.

[0420] En algunas divulgaciones, un scTCR contiene un primer segmento constituido por una secuencia de región variable de cadena α fusionada al extremo N de una secuencia de dominio constante extracelular de cadena α , y un segundo segmento constituido por una secuencia de región variable de cadena β fusionada al extremo N de una secuencia constante extracelular de cadena β y secuencia transmembrana, y, opcionalmente, una secuencia enlazadora que une el extremo C del primer segmento al extremo N del segundo segmento.

[0421] En algunas divulgaciones, un scTCR contiene un primer segmento constituido por una secuencia de región variable de cadena β de TCR fusionada al extremo N de una secuencia de dominio constante extracelular de cadena β , y un segundo segmento constituido por una secuencia de región variable de cadena α fusionada al extremo N de una secuencia constante extracelular de cadena α y secuencia transmembrana, y, opcionalmente, una secuencia enlazadora que une el extremo C del primer segmento al extremo N del segundo segmento.

[0422] En algunas divulgaciones, el enlazador de un scTCR que une los segmentos primero y segundo del TCR puede ser cualquier enlazador capaz de formar una sola cadena polipeptídica, mientras retiene la especificidad de unión al TCR. En algunas divulgaciones, la secuencia enlazadora puede, por ejemplo, tener la fórmula -P-AA-P- en la que P es prolina y AA representa una secuencia de aminoácidos en la que los aminoácidos son glicina y serina. En algunas divulgaciones, los segmentos primero y segundo están emparejados de modo que las secuencias de región variable de los mismos están orientadas para dicha unión. Por lo tanto, en algunos casos, el enlazador tiene una longitud suficiente para abarcar la distancia entre el extremo C del primer segmento y el extremo N del segundo segmento, o viceversa, pero no es demasiado largo para bloquear o reducir la unión del scTCR al ligando diana. En algunas divulgaciones, el enlazador puede contener de o aproximadamente de 10 a 45 aminoácidos, tales como de 10 a 30 aminoácidos o de 26 a 41 residuos de aminoácidos, por ejemplo 29, 30, 31 o 32 aminoácidos. En algunas divulgaciones, el enlazador tiene la fórmula -PGGG-(SGGGG)₅-P- donde P es prolina, G es glicina y S es serina (SEQ ID N.º: 16). En algunas divulgaciones, el enlazador tiene la secuencia GSADDAKKKDAKKDGKS (SEQ ID N.º: 17).

[0423] En algunas divulgaciones, el scTCR contiene un enlace disulfuro covalente que une un residuo de la región de inmunoglobulina del dominio constante de la cadena α a un residuo de la región de inmunoglobulina del dominio constante de la cadena β . En algunas divulgaciones, el enlace disulfuro entre cadenas en un TCR nativo no está presente. Por ejemplo, en algunas divulgaciones, pueden incorporarse una o más cisteínas en las secuencias extracelulares de región constante de los segmentos primero y segundo del polipéptido scTCR. En algunos casos, puede ser deseable tanto un enlace disulfuro nativo como uno no nativo.

[0424] En algunas divulgaciones de un dTCR o scTCR que contiene enlaces disulfuro entre cadenas introducidos, los enlaces disulfuro nativos no están presentes. En algunas divulgaciones, una o más de las cisteínas nativas que forman un enlace disulfuro nativo entre cadenas se sustituyen por otro residuo, como una serina o una alanina. En algunas divulgaciones, puede formarse un enlace disulfuro introducido mutando residuos no cisteína en los segmentos primero y segundo a cisteína. Los enlaces disulfuro no nativos ejemplares de un TCR se describen en el PCT internacional publicado n° WO2006/000830.

[0425] En algunas divulgaciones, el TCR o fragmento de unión a antígeno del mismo exhibe una afinidad con una constante de unión de equilibrio para un antígeno diana de entre o entre aproximadamente 10^{-5} y 10^{-12} M y todos los valores individuales y intervalos de los mismos. En algunas divulgaciones, el antígeno diana es un complejo MHC-péptido o ligando.

[0426] En algunas divulgaciones, el ácido nucleico o los ácidos nucleicos que codifican un TCR, como las cadenas α y β , pueden amplificarse por PCR, clonación u otros medios adecuados y clonarse en un vector o vectores de expresión adecuados. El vector de expresión puede ser cualquier vector de expresión recombinante adecuado, y puede utilizarse para transformar o transfectar cualquier huésped adecuado. Los vectores adecuados incluyen aquellos diseñados para la propagación y expansión o para la expresión o ambas, como los plásmidos y los virus.

[0427] En algunas divulgaciones, el vector puede ser un vector de la serie pUC (Fermentas Life Sciences), la serie pBluescript (Stratagene, La Jolla, Calif.), la serie pET (Novagen, Madison, Wis.), la serie pGEX (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia), o la serie pEX (Clontech, Palo Alto, Calif.). En algunos casos, también pueden utilizarse vectores bacteriófagos, como λ G10, λ GT11, λ ZapII (Stratagene), λ EMBL4 y λ NM1149. En algunas divulgaciones, se pueden utilizar vectores de expresión vegetal e incluyen pBI01, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 y pBIN19 (Clontech). En algunas divulgaciones, los vectores de expresión animal incluyen pEUK-CI, pMAM y pMAMneo (Clontech). En algunas divulgaciones, se utiliza un vector viral, como un vector retroviral.

[0428] En algunas divulgaciones, los vectores de expresión recombinantes pueden prepararse utilizando técnicas estándar de ADN recombinante. En algunas divulgaciones, los vectores pueden contener secuencias reguladoras, como codones de iniciación y terminación de la transcripción y la traducción, que son específicas del tipo de huésped (por ejemplo, bacteria, hongo, planta o animal) en el que se va a introducir el vector, según corresponda y teniendo en cuenta si el vector está basado en ADN o ARN. En algunas divulgaciones, el vector puede contener un promotor no nativo operativamente unido a la secuencia de nucleótidos que codifica el TCR o la porción de unión a antígeno (u otro MHC-molécula de unión a péptido). En algunas divulgaciones, el promotor puede ser un promotor no viral o un promotor viral, como un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor de SV40, un promotor de RSV y un promotor que se encuentra en la repetición largo-terminal del virus de células madre murino. También se contemplan otros promotores conocidos por un artesano experto.

[0429] En algunas divulgaciones, para generar un vector que codifica un TCR, las cadenas α y β se amplifican por PCR a partir de ADNc total aislado de un clon de células T que expresa el TCR de interés y se clonan en un vector de expresión. En algunas divulgaciones, las cadenas α y β se clonan en el mismo vector. En algunas divulgaciones, las cadenas α y β se clonan en vectores diferentes. En algunas divulgaciones, las cadenas α y β generadas se incorporan a un vector retroviral, por ejemplo lentiviral.

C. Multi-marcación

[0430] En algunas divulgaciones, las células y los métodos incluyen estrategias multi-marcación, como la expresión de dos o más receptores modificados genéticamente en la célula, cada uno de los cuales reconoce el mismo antígeno o un antígeno diferente y, por lo general, cada uno de ellos incluye un componente de señalización intracelular diferente. Dichas estrategias multiobjetivo se describen, por ejemplo, en la Solicitud Internacional de Patente, Publicación No: documento WO 2014055668 A1 (describe combinaciones de CAR activadoras y coestimuladoras, por ejemplo, dirigidas a dos antígenos diferentes presentes individualmente en células no diana, por ejemplo, normales, pero presentes conjuntamente sólo en células de la enfermedad o afección a tratar) y Fedorov et al., Sci. Transl. Medicine, 5(215) (2013) (describe células que expresan un CAR activador y otro inhibidor, como aquellas en las que el CAR activador se une a un antígeno expresado tanto en células normales o no enfermas como en células de la enfermedad o afección que se desea tratar, y el CAR inhibidor se une a otro antígeno expresado solo en las células normales o en las células que no se desea tratar).

[0431] Por ejemplo, en algunas divulgaciones, las células incluyen un receptor que expresa un primer receptor de antígeno modificado genéticamente (por ejemplo, CAR o TCR) que es capaz de inducir una señal activadora a la célula, generalmente tras la unión específica al antígeno reconocido por el primer receptor, por ejemplo, el primer antígeno. En algunas divulgaciones, la célula incluye además un segundo receptor de antígeno modificado genéticamente (por ejemplo, CAR o TCR), por ejemplo, un receptor costimulador quimérico, que es capaz de inducir una señal costimuladora a la célula inmunitaria, generalmente tras la unión específica a un segundo antígeno reconocido por el segundo receptor. En algunas divulgaciones, el primer antígeno y el segundo antígeno son el mismo. En algunas divulgaciones, el primer antígeno y el segundo antígeno son diferentes.

[0432] En algunas divulgaciones, el primer y/o segundo receptor de antígeno genéticamente modificado (por ejemplo, CAR o TCR) es capaz de inducir una señal activadora a la célula. En algunas divulgaciones, el receptor incluye un componente de señalización intracelular que contiene ITAM o motivos similares a ITAM. En algunas divulgaciones, la activación inducida por el primer receptor implica una transducción de señales o un cambio en la expresión de proteínas en la célula que da lugar a la iniciación de una respuesta inmunitaria, como la fosforilación de ITAM y/o la iniciación de la cascada de transducción de señales mediada por ITAM, la formación de una sinapsis inmunológica y/o la agrupación de moléculas cerca del receptor unido (por ej. p. ej. CD4 o CD8, etc.), activación de uno o más factores de transcripción, como NF- κ B y/o AP-1, y/o inducción de la expresión génica de factores como citoquinas, proliferación y/o supervivencia.

[0433] En algunas divulgaciones, el primer y/o segundo receptor incluye dominios de señalización intracelular de receptores costimuladores tales como CD28, CD 137 (4-1 BB), OX40, CD27, DAP10, DAP12, NKG2D, ICOS y/u otros receptores costimuladores. En algunas divulgaciones, el primer y el segundo receptor incluyen un dominio de señalización intracelular de un receptor costimulador que son diferentes. En una divulgación, el primer receptor contiene una región de

señalización coestimuladora CD28 y el segundo receptor contiene una región de señalización coestimuladora 4-1BB o viceversa.

[0434] En algunas divulgaciones, el primer y/o segundo receptor incluye tanto un dominio de señalización intracelular que contiene motivos ITAM o similares a ITAM como un dominio de señalización intracelular de un receptor coestimulador.

[0435] En algunas divulgaciones, el primer receptor contiene un dominio de señalización intracelular que contiene motivos ITAM o similares a ITAM y el segundo receptor contiene un dominio de señalización intracelular de un receptor costimulador. La señal costimuladora en combinación con la señal activadora inducida en la misma célula es la que da lugar a una respuesta inmunitaria, como una respuesta inmunitaria robusta y sostenida, como el aumento de la expresión génica, la secreción de citoquinas y otros factores, y funciones efectoras mediadas por células T, como la destrucción celular.

[0436] En algunas divulgaciones, ni la ligadura del primer receptor solo ni la ligadura del segundo receptor solo inducen una respuesta inmune robusta. En algunas divulgaciones, si sólo se liga un receptor, la célula se tolera o no responde al antígeno, o se inhibe, y/o no se induce a proliferar o secretar factores o llevar a cabo funciones efectoras. En algunas de estas divulgaciones, sin embargo, cuando la pluralidad de receptores se ligan, como al encuentro de una célula que expresa los antígenos primero y segundo, se consigue una respuesta deseada, como la activación o estimulación inmunitaria completa, por ejemplo, como se indica por la secreción de una o más citoquinas, proliferación, persistencia y/o realización de una función efectora inmunitaria como la destrucción citotóxica de una célula diana.

[0437] En algunas divulgaciones, los dos receptores inducen, respectivamente, una señal activadora y una señal inhibidora a la célula, de tal manera que la unión de uno de los receptores a su antígeno activa la célula o induce una respuesta, pero la unión del segundo receptor inhibidor a su antígeno induce una señal que suprime o amortigua esa respuesta. Algunos ejemplos son las combinaciones de CAR activadoras y CAR inhibidoras o iCAR. Dicha estrategia puede utilizarse, por ejemplo, en la que el CAR activador se une a un antígeno expresado en una enfermedad o afección pero que también se expresa en células normales, y el receptor inhibidor se une a un antígeno distinto que se expresa en las células normales pero no en las células de la enfermedad o afección.

[0438] En algunas divulgaciones, la estrategia multi-marcación se emplea cuando un antígeno asociado con una enfermedad o condición particular se expresa en una célula no enferma y/o se expresa en la propia célula manipulada, ya sea transitoriamente (*por ej.*, al ser estimulada en asociación con la ingeniería genética) o permanentemente. En tales casos, al requerir la ligadura de dos receptores de antígenos separados e individualmente específicos, puede mejorarse la especificidad, selectividad y/o eficacia.

[0439] En algunas divulgaciones, la pluralidad de antígenos, *por ej.*, el primer y segundo antígenos, se expresan en la célula, tejido, o enfermedad o condición a la que se apunta, tal como en la célula cancerosa. En algunas divulgaciones, la célula, tejido, enfermedad o afección es mieloma múltiple o una célula de mieloma múltiple. En algunas divulgaciones, uno o más de la pluralidad de antígenos generalmente también se expresa en una célula a la que no se desea dirigir la terapia celular, como una célula o tejido normal o no enfermo, y/o las propias células modificadas. En tales divulgaciones, al requerir la ligadura de múltiples receptores para lograr una respuesta de la célula, se consigue especificidad y/o eficacia.

D. Células y preparación de células para ingeniería

[0440] También se divulgan células, tales como células que contienen el receptor recombinante diseñado, tal como se describe aquí. También se divulgan poblaciones de tales células, composiciones que contienen tales células y/o enriquecidas para tales células, como en las que las células que expresan el receptor recombinante, por ejemplo, el receptor quimérico, constituyen al menos el 50, 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o más por ciento del total de células en la composición o células de un cierto tipo como células T o células CD8+ o CD4+. Entre las composiciones se encuentran las composiciones y formulaciones farmacéuticas para la administración, como por ejemplo para la terapia celular adoptiva. También se divulgan métodos terapéuticos para administrar las células y composiciones a sujetos, por ejemplo, pacientes, como de acuerdo con los métodos divulgados.

[0441] Así, también se divulgan células genéticamente diseñadas que expresan los receptores recombinantes, por ejemplo, CAR. **[0340]** Las células generalmente son células eucariotas, tales como células de mamíferos, y típicamente son células humanas. En algunas divulgaciones, las células se derivan de la sangre, médula ósea, linfa u órganos linfoides, son células del sistema inmune, como células de la inmunidad innata o adaptativa, por ejemplo, células mieloides o linfoides, incluyendo linfocitos, típicamente células T y/o células NK. Otras células ejemplares son las células madre, como las células madre multipotentes y pluripotentes, incluidas las células madre pluripotentes inducidas (iPSC). Las células suelen ser células primarias, como las aisladas directamente de un sujeto y/o aisladas de un sujeto y congeladas. En algunas divulgaciones, las células incluyen uno o más subconjuntos de células T u otros tipos de células, como poblaciones de células T completas, células CD4+, células CD8+ y subpoblaciones de las mismas, como las definidas por función, estado de activación, madurez, potencial de diferenciación, expansión, recirculación, localización y/o capacidades de persistencia, especificidad de antígeno, tipo de receptor de antígeno, presencia en un órgano o compartimento particular, perfil de secreción de marcadores o citoquinas y/o grado de diferenciación. Con referencia al sujeto a tratar, las células pueden ser alogénicas y/o autólogas. Entre los métodos se encuentran los disponibles en el mercado. En algunas

divulgaciones, como en el caso de las tecnologías comerciales, las células son pluripotentes y/o multipotentes, como las células madre, por ejemplo las células madre pluripotentes inducidas (iPSC). En algunas divulgaciones, los métodos incluyen aislar células del sujeto, prepararlas, procesarlas, cultivarlas y/o diseñarlas, como se describe en el presente documento, y reintroducirlas en el mismo paciente, antes o después de la criopreservación.

[0442] Entre los subtipos y subpoblaciones de células T y/o de células T CD4⁺ y/o CD8⁺ se encuentran los células T ingenuos (T_N), los células T efectores (T_{EFF}), los células T de memoria y sus subtipos, como los células T de memoria de células madre (T_{SCM}), los células T de memoria central (T_{CM}), los células T efectores de memoria (T_{EM}) o los células T efectores de memoria diferenciados terminalmente, los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), células T inmaduros, células T maduros, células T auxiliares, células T citotóxicas, células T invariantes asociados a mucosas (MAIT), células T reguladores (Treg) naturales y adaptativos, células T auxiliares, como células TH1, células TH2, células TH3, células TH17, células TH9, células TH22, células T auxiliares foliculares, células T alfa/beta y células T delta/gamma.

[0443] En algunas divulgaciones, las células son células asesinas naturales (NK). En algunas divulgaciones, las células son monocitos o granulocitos, por ejemplo, células mieloides, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, mastocitos, eosinófilos y/o basófilos.

[0444] En algunas divulgaciones, las células incluyen uno o más ácidos nucleicos introducidos mediante ingeniería genética, y por lo tanto expresan productos recombinantes o de ingeniería genética de dichos ácidos nucleicos. En algunas divulgaciones, los ácidos nucleicos son heterólogos, es decir, normalmente no están presentes en una célula o muestra obtenida de la célula, tal como una obtenida de otro organismo o célula, que por ejemplo, no se encuentra normalmente en la célula que está siendo manipulada y/o en un organismo del que deriva dicha célula. En algunas divulgaciones, los ácidos nucleicos no son de origen natural, como un ácido nucleico que no se encuentra en la naturaleza, incluyendo uno que comprende combinaciones quiméricas de ácidos nucleicos que codifican varios dominios de múltiples tipos de células diferentes.

[0445] En algunas divulgaciones, la fabricación, generación o producción de una terapia celular, por ejemplo, composiciones celulares terapéuticas que contienen células que expresan un receptor recombinante, puede llevarse a cabo mediante un proceso que incluye uno o más pasos de procesamiento adicionales, tales como pasos para la activación o estimulación, transducción, cultivo, expansión, lavado, suspensión, dilución, concentración y/o formulación de las células. En algunas divulgaciones, los métodos para generar o producir una terapia celular incluyen aislar células de un sujeto, preparar, procesar, cultivar bajo una o más condiciones estimulantes. En algunas divulgaciones, el método incluye pasos de procesamiento llevados a cabo en un orden en el que: las células, por ejemplo células primarias, se aíslan primero, como seleccionadas o separadas, de una muestra biológica; las células seleccionadas se incuban con partículas de vector viral para transducción, opcionalmente después de un paso de estimulación de las células aisladas en presencia de un reactivo de estimulación; cultivo de las células transducidas, como para expandir las células; formulación de las células transducidas en una composición e introducción de la composición en un recipiente de material biomédico divulgado. En algunas divulgaciones, las células de ingeniería generadas se reintroducen en el mismo sujeto, antes o después de la criopreservación.

[0446] En algunas divulgaciones, el uno o más pasos de procesamiento pueden incluir uno o más de (a) lavar una muestra biológica que contiene células (por ejemplo, una muestra de sangre entera, una muestra de capa leucocitaria, una muestra de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), una muestra de células T no fraccionadas, una muestra de linfocitos, una muestra de glóbulos blancos, un producto de aféresis, o un producto de leucaféresis), (b) aislar, por ejemplo, seleccionar, de la muestra un subconjunto o población deseada de células (por ejemplo, células T CD4⁺ y/o CD8⁺), por ejemplo, incubando las células con un reactivo de selección o inmunoafinidad para separación basada en inmunoafinidad; (c) activar y/o estimular las células exponiéndolas a condiciones estimulantes y/o reactivos estimulantes, lo que puede realizarse antes, durante y/o después de la incubación de las células con partículas de vectores virales, (d) incubar las células aisladas, como las seleccionadas, con partículas de vectores virales, por ejemplo, transducir las células, (e) cultivar, cultivar o expandir las células utilizando métodos como los descritos y (f) formular las células transducidas, por ejemplo en un tampón farmacéuticamente aceptable, criopreservante u otro medio adecuado. En algunas divulgaciones, las células de la muestra de PBMC, la muestra de células T no fraccionadas, la muestra de linfocitos, la muestra de glóbulos blancos, el producto de aféresis o el producto de leucaféresis se criocongelan y luego se descongelan antes de cualquier paso para aislar, seleccionar, incubar, transducir, transfectar, cultivar, expandir y/o formular las células.

[0447] En algunas divulgaciones, uno o más pasos adicionales de lavado o suspensión, tales como dilución, concentración y/o intercambio de tampón de las células, también pueden llevarse a cabo antes o después de cualquiera de los pasos anteriores. En algunas divulgaciones, la composición celular de ingeniería resultante se introduce en uno o más recipientes de cultivo biomédico divulgados.

[0448] En algunas divulgaciones, uno, más, o todos los pasos en la preparación de células para uso clínico, por ejemplo, en terapia celular adoptiva, son llevados a cabo sin exponer las células a condiciones no estériles y sin la necesidad de usar un cuarto o gabinete estéril. En algunas divulgaciones de dicho proceso, las células son aisladas, separadas o seleccionadas, transducidas, lavadas, opcionalmente activadas o estimuladas y formuladas, todo ello dentro de un sistema cerrado. En algunas divulgaciones de dicho proceso, las células se expresan a partir de un sistema cerrado y se introducen en uno o más de los vasos de biomaterial. En algunas divulgaciones, los métodos se llevan a cabo de forma

automatizada. En algunas divulgaciones, uno o más de los pasos se lleva a cabo aparte del sistema o dispositivo cerrado.

[0449] En algunas divulgaciones, se utiliza un sistema cerrado para llevar a cabo uno o más de los otros pasos de procesamiento de un método para fabricar, generar o producir una terapia celular. En algunas divulgaciones, uno o más o todos los pasos de procesamiento, por ejemplo, aislamiento, selección y/o enriquecimiento, procesamiento, incubación en relación con la transducción y la ingeniería, y los pasos de formulación se llevan a cabo utilizando un sistema, dispositivo o aparato en un sistema integrado o autónomo, y/o de forma automatizada o programable. En algunas divulgaciones, el sistema o aparato incluye un ordenador y/o programa informático en comunicación con el sistema o aparato, que permite a un usuario programar, controlar, evaluar el resultado de y/o ajustar diversos aspectos de los pasos de procesamiento, aislamiento, ingeniería y formulación. En una divulgación, el sistema es un sistema como el descrito en la Solicitud Internacional de Patente, Número de Publicación WO2009/072003, o US 20110003380 A1. En una divulgación, el sistema es un sistema como el descrito en la Publicación Internacional Número WO2016/073602.

[0450] En algunas divulgaciones, la preparación de las células de ingeniería incluye uno o más pasos de cultivo y/o preparación. Las células para la introducción del receptor recombinante, por ejemplo, CAR, pueden aislarse de una muestra, como una muestra biológica, por ejemplo, una obtenida de o derivada de un sujeto. En algunas divulgaciones, el sujeto del que se aísla la célula es uno que padece la enfermedad o afección o que necesita una terapia celular o al que se le administrará la terapia celular. En algunas divulgaciones, el sujeto es un ser humano que necesita una intervención terapéutica concreta, como la terapia celular adoptiva para la que se aíslan, procesan y/o diseñan las células.

[0451] Por consiguiente, las células en algunas divulgaciones son células primarias, por ejemplo, células humanas primarias. Las muestras incluyen tejidos, fluidos y otras muestras tomadas directamente del sujeto, así como muestras resultantes de uno o más pasos de procesamiento, como separación, centrifugación, ingeniería genética (*por ej.*, transducción con vector viral), lavado y/o incubación. La muestra biológica puede ser una muestra obtenida directamente de una fuente biológica o una muestra procesada. Las muestras biológicas incluyen, entre otras, fluidos corporales como sangre, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, orina y sudor, muestras de tejidos y órganos, incluidas las muestras procesadas derivadas de los mismos.

[0452] En algunas divulgaciones, la muestra de la cual las células son derivadas o aisladas es sangre o una muestra derivada de sangre, o es o es derivada de un producto de aféresis o leucaféresis. Entre las muestras ejemplares se incluyen sangre total, células mononucleares de sangre periférica (PBMC), leucocitos, médula ósea, timo, biopsia de tejido, tumor, leucemia, linfoma, ganglio linfático, tejido linfóide asociado a intestino, tejido linfóide asociado a mucosa, bazo, otros tejidos linfoides, hígado, pulmón, estómago, intestino, colon, riñón, páncreas, mama, hueso, próstata, cuello uterino, testículos, ovarios, amígdala u otro órgano, y/o células derivadas de los mismos. Las muestras incluyen, en el contexto de la terapia celular, *por ej.*, la terapia celular adoptiva, muestras de fuentes autólogas y alogénicas.

[0453] En algunas divulgaciones, las células se derivan de líneas celulares, por ejemplo, líneas de células T. En algunas divulgaciones, las células se obtienen de una fuente xenogénica, por ejemplo, de ratón, rata, primate no humano o cerdo.

[0454] En algunas divulgaciones, el aislamiento de las células incluye uno o más pasos de preparación y/o separación celular no basada en afinidad. En algunas divulgaciones, las células se lavan, centrifugan y/o incuban en presencia de uno o más reactivos, por ejemplo, para eliminar componentes no deseados, enriquecer para componentes deseados, lisar o eliminar células sensibles a determinados reactivos. En algunas divulgaciones, las células se separan en función de una o más propiedades, como la densidad, las propiedades adherentes, el tamaño, la sensibilidad y/o la resistencia a determinados componentes.

[0455] En algunas divulgaciones, se obtienen células de la sangre circulante de un sujeto, por ejemplo, por aféresis o leucaféresis. Las muestras, en algunas divulgaciones, contienen linfocitos, incluyendo células T, monocitos, granulocitos, células B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y/o plaquetas, y en algunas divulgaciones contiene células distintas de los glóbulos rojos y las plaquetas.

[0456] En algunas divulgaciones, las células sanguíneas recogidas del sujeto se lavan, *por ej.*, para eliminar la fracción de plasma y colocar las células en un tampón o medio apropiado para los pasos de procesamiento posteriores. En algunas divulgaciones, las células se lavan con solución salina tamponada con fosfato (PBS). En algunas divulgaciones, la solución de lavado carece de calcio y/o magnesio y/o muchos o todos los cationes divalentes. En algunas divulgaciones, se realiza un paso de lavado utilizando una centrifugadora semiautomática de "flujo continuo" (*por ejemplo*, el procesador celular Cobe 2991, Baxter) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En algunas divulgaciones, se realiza una etapa de lavado en una cámara centrífuga, por ejemplo las producidas y vendidas por Biosafe SA, incluidas las que se utilizan con el sistema Sepax® y Sepax® 2, incluidas las cámaras centrífugas A-200/F y A-200 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En algunas divulgaciones, la etapa de lavado se realiza mediante filtración de flujo tangencial (TFF) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En algunas divulgaciones, las células se resuspenden en una variedad de tampones biocompatibles después del lavado, como, por ejemplo, PBS sin Ca⁺⁺/Mg⁺⁺. En ciertas divulgaciones, los componentes de una muestra de células sanguíneas se eliminan y las células se resuspenden directamente en medios de cultivo.

[0457] En algunas divulgaciones, los métodos incluyen métodos de separación celular basados en la densidad, como la preparación de glóbulos blancos a partir de sangre periférica lisando los glóbulos rojos y centrifugando a través de un

gradiente Percoll o Ficoll.

[0458] En algunas divulgaciones, los métodos de aislamiento incluyen la separación de diferentes tipos celulares basados en la expresión o presencia en la célula de una o más moléculas específicas, tales como marcadores de superficie, *por ej.*, proteínas de superficie, marcadores intracelulares, o ácido nucleico. En algunas divulgaciones, puede utilizarse cualquier método conocido de separación basado en dichos marcadores. En algunas divulgaciones, la separación se basa en afinidad o inmutafinidad. Por ejemplo, el aislamiento en algunas divulgaciones incluye la separación de células y poblaciones celulares basada en la expresión de las células o el nivel de expresión de uno o más marcadores, típicamente marcadores de superficie celular, por ejemplo, por incubación con un anticuerpo o compañero de unión que se une específicamente a tales marcadores, seguido generalmente por pasos de lavado y separación de las células que se han unido al anticuerpo o compañero de unión, de aquellas células que no se han unido al anticuerpo o compañero de unión.

[0459] Tales pasos de separación pueden basarse en la selección positiva, en la que las células que se han unido a los reactivos se retienen para su uso posterior, y/o en la selección negativa, en la que se retienen las células que no se han unido al anticuerpo o al compañero de unión. En algunas divulgaciones, ambas fracciones se conservan para su uso posterior. En algunas divulgaciones, la selección negativa puede ser particularmente útil cuando no se dispone de ningún anticuerpo que identifique específicamente un tipo de célula en una población heterogénea, de manera que la separación se realiza mejor basándose en marcadores expresados por células distintas de la población deseada.

[0460] No es necesario que la separación resulte en un enriquecimiento o eliminación del 100% de una población celular particular o de células que expresen un marcador particular. Por ejemplo, la selección positiva o el enriquecimiento de células de un tipo particular, como las que expresan un marcador, se refiere al aumento del número o porcentaje de dichas células, pero no tiene por qué dar lugar a una ausencia total de células que no expresen el marcador. Del mismo modo, la selección negativa, eliminación o agotamiento de células de un tipo particular, como las que expresan un marcador, se refiere a la disminución del número o porcentaje de dichas células, pero no tiene por qué dar lugar a una eliminación completa de todas ellas.

[0461] En algunas divulgaciones, se llevan a cabo múltiples rondas de pasos de separación, donde la fracción seleccionada positiva o negativamente de un paso se somete a otro paso de separación, tal como una selección positiva o negativa subsiguiente. En algunas divulgaciones, un único paso de separación puede agotar las células que expresan múltiples marcadores simultáneamente, como por ejemplo incubando las células con una pluralidad de anticuerpos o compañeros de unión, cada uno específico para un marcador dirigido a la selección negativa. Del mismo modo, se pueden seleccionar positivamente múltiples tipos celulares de forma simultánea incubando las células con una pluralidad de anticuerpos o compañeros de unión expresados en los distintos tipos celulares.

[0462] Por ejemplo, en algunas divulgaciones, subpoblaciones específicas de células T, tales como células positivas o que expresan altos niveles de uno o más marcadores de superficie, por ejemplo, células T CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+, y/o CD45RO+, se aíslan mediante técnicas de selección positiva o negativa.

[0463] Por ejemplo, las células T CD3+, CD28+ pueden ser seleccionadas positivamente usando perlas magnéticas conjugadas CD3/CD28 (por ejemplo, DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T Cell Expander).

[0464] En algunas divulgaciones, el aislamiento se lleva a cabo por enriquecimiento para una población celular particular por selección positiva, o agotamiento de una población celular particular, por selección negativa. En algunas divulgaciones, la selección positiva o negativa se logra incubando las células con uno o más anticuerpos u otro agente de unión que se unen específicamente a uno o más marcadores de superficie expresados o expresados (marcador⁺) a un nivel relativamente más alto (marcador^{high}) en las células seleccionadas positiva o negativamente, respectivamente.

[0465] En algunas divulgaciones, las células T se separan de una muestra de PBMC por selección negativa de marcadores expresados en células no T, como células B, monocitos u otros glóbulos blancos, como CD14. En algunas divulgaciones, se utiliza un paso de selección CD4+ o CD8+ para separar las células T auxiliares CD4+ de las citotóxicas CD8+. Dichas poblaciones de CD4+ y CD8+ pueden clasificarse en subpoblaciones mediante selección positiva o negativa para marcadores expresados o expresados en un grado relativamente mayor en una o más subpoblaciones de células T ingenuas, de memoria y/o efectoras.

[0466] En algunas divulgaciones, las células CD8+ se enriquecen aún más para o se agotan de células madre ingenuas, de memoria central, de memoria efectoras y/o de memoria central, como por selección positiva o negativa basada en antígenos de superficie asociados con la subpoblación respectiva. En algunas divulgaciones, el enriquecimiento para células T de memoria central (TCM) se lleva a cabo para aumentar la eficacia, como para mejorar la supervivencia a largo plazo, la expansión y/o el injerto tras la administración, que en algunas divulgaciones es particularmente robusta en tales subpoblaciones. Véase Terakura et al. (2012) Blood. 1:72-82; Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701. En algunas divulgaciones, la combinación de células T CD8+ enriquecidas con MTC y células T CD4+ mejora aún más la eficacia.

[0467] En las divulgaciones, las células T de memoria están presentes en los subconjuntos CD62L+ y CD62L- de los linfocitos CD8+ de sangre periférica. Las PBMC pueden enriquecerse o eliminarse de las fracciones CD62L-CD8+ y/o CD62L+CD8+, por ejemplo utilizando anticuerpos anti-CD8 y anti-CD62L.

[0468] En algunas divulgaciones, el enriquecimiento para células T de memoria central (TCM) se basa en la expresión superficial positiva o alta de CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3, y/o CD127; en algunas divulgaciones, se basa en la selección negativa para células que expresan o expresan altamente CD45RA y/o granzima B. En algunas divulgaciones, el aislamiento de una población CD8+ enriquecida para células MTC se lleva a cabo por agotamiento de células que expresan CD4, CD14, CD45RA, y selección positiva o enriquecimiento para células que expresan CD62L. En una divulgación, el enriquecimiento para células T de memoria central (MTC) se lleva a cabo comenzando con una fracción negativa de células seleccionadas en función de la expresión de CD4, que se somete a una selección negativa en función de la expresión de CD14 y CD45RA, y a una selección positiva en función de CD62L. Tales selecciones en algunas divulgaciones se llevan a cabo simultáneamente y en otras divulgaciones se llevan a cabo secuencialmente, en cualquier orden. En algunas divulgaciones, el mismo paso de selección basado en la expresión de CD4 utilizado en la preparación de la población o subpoblación de células CD8+, también se utiliza para generar la población o subpoblación de células CD4+, de forma que tanto las fracciones positivas como las negativas de la separación basada en CD4 se conservan y utilizan en pasos posteriores de los métodos, opcionalmente tras uno o más pasos de selección positiva o negativa adicionales.

[0469] En una divulgación particular, una muestra de PBMCs u otra muestra de glóbulos blancos es sometida a selección de células CD4+, donde ambas fracciones, negativa y positiva, son retenidas. A continuación, la fracción negativa se somete a una selección negativa basada en la expresión de CD14 y CD45RA o ROR1, y a una selección positiva basada en un marcador característico de las células T de memoria central, como CD62L o CCR7, donde las selecciones positiva y negativa se llevan a cabo en cualquier orden.

[0470] Las células T auxiliares CD4+ se clasifican en ingenuas, de memoria central y efectoras mediante la identificación de poblaciones celulares que tienen antígenos de superficie celular. Los linfocitos CD4+ pueden obtenerse por métodos estándar. En algunas divulgaciones, los linfocitos T CD4+ ingenuos son linfocitos T CD4+ CD45RO-, CD45RA+, CD62L+. En algunas divulgaciones, las células CD4+ de memoria central son CD62L+ y CD45RO+. En algunas divulgaciones, las células efectoras CD4+ son CD62L- y CD45RO-.

[0471] En una divulgación, para enriquecer para células CD4+ por selección negativa, un cóctel de anticuerpos monoclonales típicamente incluye anticuerpos para CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR, y CD8. En algunas divulgaciones, el anticuerpo o compañero de unión está unido a un soporte sólido o matriz, como una perla magnética o paramagnética, para permitir la separación de células para la selección positiva y/o negativa. Por ejemplo, en algunas divulgaciones, las células y poblaciones celulares se separan o aíslan utilizando técnicas de separación inmunomagnéticas (o afinimagnéticas) (revisadas en Methods in Molecular Medicine, vol. 58.); Metastasis Research Protocols, Vol. 2: Cell Behavior In vitro and In vivo, p 17-25 Editado por: S. A. Brooks and U. Schumacher © Humana Press Inc., Totowa, NJ).

[0472] En algunas divulgaciones, dos o más pasos de selección pueden ser realizados secuencialmente. Por ejemplo, la muestra o composición de células a separar se somete a una selección de células CD8+, en la que se retienen tanto las fracciones negativas como las positivas. La fracción CD8 negativa puede someterse además a una selección de células CD4+. En algunas divulgaciones, la muestra o composición de células a separar se somete a selección de células CD4+, donde se retienen tanto la fracción negativa como la positiva y la fracción CD4 negativa puede someterse a selección de células CD8+. En los números de publicación de solicitud de patente internacional WO2015157384 y/o WO 2015/164675 se describen métodos ejemplares para la selección de células, todos o parte de los cuales podrían utilizarse en relación con los métodos descritos en el presente documento.

[0473] En algunas divulgaciones, la muestra o composición de células a ser separadas es incubada con material pequeño, magnetizable o magnéticamente responsivo, tales como partículas o micropartículas magnéticamente responsivas, tales como perlas paramagnéticas (por ejemplo, tales como Dynalbeads o MACS beads). El material con respuesta magnética, *por ej.*, la partícula, generalmente está unido directa o indirectamente a un compañero de unión, *por ej.*, un anticuerpo, que se une específicamente a una molécula, *por ej.*, un marcador de superficie, presente en la célula, células o población de células que se desea separar, *por ej.*, que se desea seleccionar negativa o positivamente.

[0474] En algunas divulgaciones, la partícula o esfera magnética comprende un material magnéticamente sensible unido a un miembro de unión específico, tal como un anticuerpo u otro compañero de unión. Hay muchos materiales magnéticamente sensibles bien conocidos que se utilizan en los métodos de separación magnética. Las partículas magnéticas adecuadas incluyen las descritas en Molday, Pat. de EE.UU. N.º 4.452.773, y en la Especificación de Patente Europea EP 452342 B. Partículas de tamaño coloidal, como las descritas en Owen Pat. de EE.UU. N.º 4,795,698, and Liberti et al., Pat. de EE.UU. N.º 5.200.084 son otros ejemplos.

[0475] La incubación generalmente se lleva a cabo bajo condiciones en las que los anticuerpos o compañeros de unión, o moléculas, tales como anticuerpos secundarios u otros reactivos, que se unen específicamente a dichos anticuerpos o compañeros de unión, que están unidos a la partícula magnética o esfera, se unen específicamente a moléculas de la superficie celular si están presentes en las células dentro de la muestra.

[0476] En algunas divulgaciones, la muestra es colocada en un campo magnético, y aquellas células que tienen partículas

magnéticamente responsivas o magnetizables adheridas serán atraídas al imán y separadas de las células no marcadas. Para la selección positiva, se retienen las células que son atraídas por el imán; para la selección negativa, se retienen las células que no son atraídas (células no marcadas). En algunas divulgaciones, se realiza una combinación de selección positiva y negativa durante la misma etapa de selección, en la que las fracciones positivas y negativas se retienen y se procesan posteriormente o se someten a otras etapas de separación.

[0477] En ciertas divulgaciones, las partículas magnéticamente sensibles están recubiertas en anticuerpos primarios u otros socios de unión, anticuerpos secundarios, lectinas, enzimas o estreptavidina. En ciertas divulgaciones, las partículas magnéticas se adhieren a las células mediante un recubrimiento de anticuerpos primarios específicos para uno o más marcadores. En determinadas divulgaciones, las células, en lugar de las microesferas, se marcan con un anticuerpo primario o un compañero de unión y, a continuación, se añaden partículas magnéticas recubiertas de anticuerpos secundarios específicos del tipo celular u otro compañero de unión (por ejemplo, estreptavidina). En ciertas divulgaciones, las partículas magnéticas recubiertas de estreptavidina se utilizan junto con anticuerpos primarios o secundarios biotinilados.

[0478] En algunas divulgaciones, las partículas magnéticamente sensibles se dejan adheridas a las células que van a ser posteriormente incubadas, cultivadas y/o manipuladas; en algunos aspectos, las partículas se dejan adheridas a las células para su administración a un paciente. En algunas divulgaciones, las partículas magnetizables o que responden magnéticamente se retiran de las células. Los métodos para eliminar partículas magnetizables de las células son conocidos e incluyen, por ejemplo, el uso de anticuerpos no marcados competidores, partículas magnetizables o anticuerpos conjugados con enlazadores escindibles, etc. En algunas divulgaciones, las partículas magnetizables son biodegradables.

[0479] En algunas divulgaciones, la selección basada en la afinidad se realiza mediante clasificación celular activada magnéticamente (MACS) (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Los sistemas MACS (Magnetic Activated Cell Sorting) son capaces de seleccionar células de gran pureza con partículas magnetizadas adheridas a ellas. En ciertas divulgaciones, el MACS funciona en un modo en el que las especies objetivo y no objetivo se eluyen secuencialmente tras la aplicación del campo magnético externo. Es decir, las células adheridas a las partículas magnetizadas se mantienen en su lugar mientras se eluyen las especies no adheridas. A continuación, una vez completado este primer paso de elución, las especies que quedaron atrapadas en el campo magnético y no pudieron ser eluidas se liberan de alguna manera para que puedan ser eluidas y recuperadas. En ciertas divulgaciones, las células no diana se marcan y se eliminan de la población heterogénea de células.

[0480] En ciertas divulgaciones, el aislamiento o separación se lleva a cabo usando un sistema, dispositivo o aparato que lleva a cabo uno o más de los pasos de aislamiento, preparación celular, separación, procesamiento, incubación, cultivo y/o formulación de los métodos. En algunas divulgaciones, el sistema se utiliza para llevar a cabo cada uno de estos pasos en un entorno cerrado o estéril, por ejemplo, para minimizar los errores, la manipulación por parte del usuario y/o la contaminación. En una divulgación, el sistema es un sistema como el descrito en la Solicitud Internacional de Patente, Número de Publicación WO2009/072003, o US 20110003380 A1. En algunas divulgaciones, el producto de aféresis o leucaféresis, o una muestra derivada del mismo, se procesa y/o el aislamiento o selección se lleva a cabo utilizando un sistema, dispositivo, aparato y/o método como se describe en la Solicitud de Patente Internacional Número de Publicación WO2016/073602 o US 2016/0122782. En algunas divulgaciones, el aislamiento o separación se lleva a cabo según los métodos descritos en la Solicitud de Patente Internacional Número de Publicación WO 2015/164675.

[0481] En algunas divulgaciones, el sistema o aparato lleva a cabo uno o más, *por ej.*, todos los pasos de aislamiento, procesamiento, ingeniería y formulación en un sistema integrado o autónomo, y/o de forma automatizada o programable. En algunas divulgaciones, el sistema o aparato incluye un ordenador y/o programa informático en comunicación con el sistema o aparato, que permite a un usuario programar, controlar, evaluar el resultado de y/o ajustar diversos aspectos de los pasos de procesamiento, aislamiento, ingeniería y formulación.

[0482] En algunas divulgaciones, la separación y/u otros pasos se llevan a cabo utilizando el sistema CliniMACS (Miltenyi Biotec), por ejemplo, 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 varias válvulas de pellizco. El ordenador integrado en algunas divulgaciones controla todos los componentes del instrumento y dirige el sistema para realizar procedimientos repetidos en una secuencia estandarizada. En algunas divulgaciones, la unidad de separación magnética incluye un imán permanente móvil y un soporte para la columna de selección. La bomba peristáltica controla el caudal en todo el conjunto de tubos y, junto con las válvulas de pinzamiento, garantiza el flujo controlado de tampón a través del sistema y la suspensión continua de las células.

[0483] El sistema CliniMACS en algunas divulgaciones utiliza partículas magnetizables acopladas a anticuerpos que se suministran en una solución estéril, no pirogénica. En algunas divulgaciones, después de marcar las células con partículas magnéticas, las células se lavan para eliminar el exceso de partículas. A continuación, se conecta una bolsa de preparación celular al conjunto de tubos, que a su vez está conectado a una bolsa que contiene tampón y a una bolsa de recogida de células. El juego de tubos consta de tubos estériles premontados, que incluyen una precolumna y una columna de separación, y son de un solo uso. Una vez iniciado el programa de separación, el sistema aplica automáticamente la muestra celular en la columna de separación. Las células marcadas quedan retenidas en la columna, mientras que las no

marcadas se eliminan mediante una serie de lavados. En algunas divulgaciones, las poblaciones celulares para su uso con los métodos aquí descritos no están marcadas y no se retienen en la columna. En algunas divulgaciones, las poblaciones celulares para su uso con los métodos aquí descritos están marcadas y se retienen en la columna. En algunas divulgaciones, las poblaciones celulares 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.

[0484] En ciertas divulgaciones, la separación y/u otros pasos se llevan a cabo utilizando el sistema CliniMACS Prodigy (Miltenyi Biotec). En algunas divulgaciones, el sistema CliniMACS Prodigy está equipado con una unidad de procesamiento celular que permite el lavado y fraccionamiento automatizado de las células mediante centrifugación. El sistema CliniMACS Prodigy también puede incluir una cámara integrada y un software de reconocimiento de imágenes que determina el punto final óptimo de fraccionamiento celular discerniendo las capas macroscópicas del producto celular de origen. Por ejemplo, la sangre periférica puede separarse automáticamente en capas de eritrocitos, leucocitos y plasma. El sistema CliniMACS Prodigy también puede incluir una cámara de cultivo celular integrada que realiza protocolos de cultivo celular como, *por ej.*, diferenciación y expansión celular, carga de antígenos y cultivo celular a largo plazo. Los puertos de entrada permiten la extracción y reposición estéril de los medios, y las células pueden controlarse mediante un microscopio integrado. Véase, p. ej., Klebanoff et al. (2012) J Immunother. 35(9): 651-660, Terakura et al. (2012) Blood. 1:72-82, and Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701.

[0485] En algunas divulgaciones, una población celular descrita en el presente documento se recoge y enriquece (o agota) mediante citometría de flujo, en la que las células teñidas para múltiples marcadores de superficie celular se transportan en una corriente fluidica. En algunas divulgaciones, una población celular descrita en el presente documento se recoge y enriquece (o agota) mediante clasificación a escala preparativa (FACS). En ciertas divulgaciones, una población celular descrita en el presente documento se recoge y enriquece (o agota) mediante el uso de chips de sistemas microelectromecánicos (MEMS) en combinación con un sistema de detección basado en FACS (véase, por ejemplo, WO 2010/033140, Cho et al. (2010); and Godin et al.

[0486] (2008) J Biophoton. 1(5):355-376. En ambos casos, las células pueden marcarse con múltiples marcadores, lo que permite aislar subconjuntos de células T bien definidos y de gran pureza.

[0487] En algunas divulgaciones, los anticuerpos o socios de unión se marcan con uno o más marcadores detectables, para facilitar la separación para la selección positiva y/o negativa. Por ejemplo, la separación puede basarse en la unión a anticuerpos marcados con fluorescencia. En algunas divulgaciones, la separación de células basada en la unión de anticuerpos u otros socios de unión específicos para uno o más marcadores de superficie celular se lleva a cabo en una corriente fluidica, como por ejemplo mediante la clasificación de células activada por fluorescencia (FACS), incluyendo chips a escala preparativa (FACS) y/o sistemas microelectromecánicos (MEMS), por ejemplo, en combinación con un sistema de detección citométrica de flujo. Estos métodos permiten la selección positiva y negativa basada en múltiples marcadores simultáneamente.

[0488] En algunas divulgaciones, los métodos de preparación incluyen pasos para congelar, *por ej.*, criopreservar, las células, ya sea antes o después del aislamiento, incubación y/o ingeniería. En algunas divulgaciones, el paso de congelación y posterior descongelación elimina los granulocitos y, en cierta medida, los monocitos de la población celular. En algunas divulgaciones, las células se suspenden en una solución de congelación, por ejemplo, después de una etapa de lavado para eliminar el plasma y las plaquetas. Puede utilizarse cualquiera de las diversas soluciones y parámetros de congelación conocidos en algunas divulgaciones. Un ejemplo consiste en utilizar PBS que contenga un 20% de DMSO y un 8% de albúmina sérica humana (HSA), u otros medios de congelación celular adecuados. A continuación, se diluye 1:1 con los medios de forma que la concentración final de DMSO y HSA sea del 10% y 4%, respectivamente. En algunas divulgaciones, las células se congelan por cualquier método, y/o con cualquier reactivo, recipiente, solución de congelación, y/o crioprotector descrito en el presente documento. En algunas divulgaciones, las células se congelan entonces a -80° C. a una velocidad de o de aproximadamente 1° por minuto y se almacenan en la fase de vapor de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido.

[0489] En algunas divulgaciones, los métodos divulgados incluyen pasos de cultivo, incubación, cultura y/o ingeniería genética. Por ejemplo, en algunas divulgaciones, se divulgan métodos para incubar y/o diseñar las poblaciones celulares agotadas y las composiciones iniciadoras del cultivo.

[0490] Así, en algunas divulgaciones, las poblaciones celulares se incuban en una composición iniciadora de cultivo. La incubación y/o ingeniería puede llevarse a cabo en un recipiente de cultivo, como una unidad, cámara, pocillo, columna, tubo, conjunto de tubos, válvula, vial, placa de cultivo, bolsa u otro recipiente para el cultivo o cultivo de células.

[0491] En algunas divulgaciones, las células son incubadas y/o cultivadas antes o en conexión con la ingeniería genética. Los pasos de incubación pueden incluir el cultivo, la estimulación, la activación y/o la propagación. En algunas divulgaciones, las composiciones o las células se incuban en presencia de condiciones estimulantes o de un agente estimulante. Dichas condiciones incluyen aquellas diseñadas para inducir la proliferación, expansión, activación y/o supervivencia de las células de la población, para imitar la exposición al antígeno y/o para preparar las células para la ingeniería genética, como por ejemplo para la introducción de un receptor de antígeno recombinante.

- [0492] Las condiciones pueden incluir uno o más de los medios particulares, temperatura, contenido de oxígeno, contenido de dióxido de carbono, tiempo, agentes, *por ej.*, nutrientes, aminoácidos, antibióticos, iones, y/o factores estimulantes, tales como citoquinas, quimioquinas, antígenos, socios de unión, proteínas de fusión, receptores solubles recombinantes, y cualquier otro agente diseñado para activar las células. En algunas divulgaciones, las células se incuban en presencia de una o más citoquinas y en algunas divulgaciones se puede emplear un cóctel de citoquinas, por ejemplo como se describe en la Solicitud de Patente Internacional Número de Publicación WO2015157384. En algunas divulgaciones, las células se incuban con una o más citocinas y/o un cóctel de citocinas antes, simultáneamente o después de la transducción.
- [0493] En algunas divulgaciones, las condiciones o agentes estimulantes incluyen uno o más agentes, por ejemplo, ligando, que es capaz de activar un dominio de señalización intracelular de un complejo TCR. En algunas divulgaciones, el agente activa o inicia la cascada de señalización intracelular TCR/CD3 en una célula T. Dichos agentes pueden incluir anticuerpos, como los específicos para un TCR, por ejemplo, anti-CD3. En algunas divulgaciones, las condiciones estimulantes incluyen uno o más agentes, por ejemplo, ligandos, que son capaces de estimular un receptor costimulador, por ejemplo, anti-CD28. En algunas divulgaciones, dichos agentes y/o ligandos pueden estar unidos a un soporte sólido, como una perla, y/o a una o más citocinas. En el presente documento se describen reactivos estimuladores ejemplares, como por ejemplo en la Sección V-D-1. Opcionalmente, el método de expansión puede comprender además el paso de añadir anticuerpos anti-CD3 y/o anti CD28 al medio de cultivo (por ejemplo, a una concentración de al menos aproximadamente 0,5 ng/ml). En algunas divulgaciones, los agentes estimulantes incluyen IL-2, IL-15 y/o IL-7. En algunas divulgaciones, la concentración de IL-2 es de al menos unas 10 unidades/mL. En algunas divulgaciones, los agentes estimulantes incluyen IL-2, IL-7 y/o IL-15, por ejemplo, en concentraciones de, de al menos, o de aproximadamente 10 unidades/mL, 20 unidades/mL, 50 unidades/mL, 100 unidades/mL, 250 unidades/mL, 500 unidades/mL, 600 unidades/mL, 700 unidades/mL, 800 unidades/mL, 900 unidades/mL, o 1.000 unidades/mL.
- [0494] En algunas divulgaciones, la incubación se lleva a cabo de acuerdo con técnicas como las descritas en la Patente de EE.UU. N° 6.040.177 a Riddell et al., Klebanoff et al. (2012) J Immunother. 35(9): 651-660, Terakura et al. (2012) Blood. 117:72-82, y/o Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701. En algunas divulgaciones, la incubación se lleva a cabo utilizando un sistema, dispositivo, aparato y/o método como se describe en la solicitud de patente internacional número de publicación WO2016/073602 o US 2016/0122782. En algunas divulgaciones, la incubación y/o el cultivo se llevan a cabo según los métodos descritos en la Solicitud de Patente Internacional Número de Publicación WO 2015/164675. En algunas divulgaciones, al menos una parte de la incubación realizada en una cámara centrífuga incluye la mezcla con un reactivo o reactivos para inducir la estimulación y/o activación. En algunas divulgaciones, las células, como las células seleccionadas, se mezclan con una condición estimulante o un agente estimulante en la cámara centrífuga. En algunas divulgaciones de tales procesos, un volumen de células se mezcla con una cantidad de una o más condiciones o agentes estimulantes que es mucho menor que la que se emplea normalmente al realizar estimulaciones similares en una placa de cultivo celular u otro sistema.
- [0495] En algunas divulgaciones, el agente estimulante se agrega a las células en la cavidad de la cámara en una cantidad que es sustancialmente menor que (por ej. no es superior al 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% u 80% de la cantidad) en comparación con la cantidad del agente estimulante que se utiliza típicamente o que sería necesaria para lograr aproximadamente la misma o similar eficacia de selección del mismo número de células o del mismo volumen de células cuando la selección se realiza sin mezclar en una cámara centrífuga, por ejemplo, en un tubo o bolsa con agitación o rotación periódica. En algunas divulgaciones, la incubación se realiza con la adición de un tampón de incubación a las células y el agente estimulante para lograr un volumen objetivo con la incubación del reactivo de, por ejemplo, 10 mL a 200 mL, tal como al menos o aproximadamente al menos o aproximadamente 10 mL, 20 mL, 30 mL, 40 mL, 50 mL, 60 mL, 70 mL, 80 mL, 90 mL, 100 mL, 150 mL, o 200 mL. En algunas divulgaciones, el tampón de incubación y el agente estimulante se mezclan previamente antes de la adición a las células. En algunas divulgaciones, el tampón de incubación y el agente estimulante se añaden por separado a las células. En algunas divulgaciones, la incubación estimulante se lleva a cabo con condiciones periódicas de mezclado suave, lo que puede ayudar a promover interacciones energéticamente favorecidas y, por lo tanto, permitir el uso de menos agente estimulante en general mientras se logra la estimulación y activación de las células.
- [0496] En algunas divulgaciones, la incubación generalmente se lleva a cabo bajo condiciones de mezclado, tales como en presencia de centrifugación, generalmente a una fuerza o velocidad relativamente baja, tal como una velocidad menor que la usada para granular las células, tal como de o de aproximadamente 600 rpm a 1700 rpm (e.p. ej. a o aproximadamente o al menos 600 rpm, 1000 rpm, o 1500 rpm o 1700 rpm), tal como a una FCR en la muestra o pared de la cámara u otro recipiente de o aproximadamente 80 g a 100 g (p. ej. a o aproximadamente o al menos 80 g, 85 g, 90 g, 95 g o 100 g). En algunas divulgaciones, el centrifugado se lleva a cabo utilizando intervalos repetidos de un centrifugado a dicha baja velocidad seguido de un periodo de descanso, como un centrifugado y/o descanso durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 segundos, como un centrifugado a aproximadamente 1 o 2 segundos seguido de un descanso durante aproximadamente 5, 6, 7, u 8 segundos.
- [0497] En algunas divulgaciones, la duración total de la incubación, por ejemplo con el agente estimulante, es entre o aproximadamente 1 hora y 96 horas, 1 hora y 72 horas, 1 hora y 48 horas, 4 horas y 36 horas, 8 horas y 30 horas o 12 horas y 24 horas, tal como al menos o aproximadamente al menos 6 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas o 72 horas, cada una inclusive. En algunas divulgaciones, la incubación adicional es por un tiempo entre o aproximadamente

entre 1 hora y 48 horas, 4 horas y 36 horas, 8 horas y 30 horas o 12 horas y 24 horas, cada una inclusive.

[0498] En algunas divulgaciones, los pasos de procesamiento incluyen la introducción de una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína recombinante. Entre dichas proteínas recombinantes se encuentran los receptores recombinantes, como cualquiera de los descritos en la Sección V. La introducción de las moléculas de ácido nucleico que codifican la proteína recombinante, como el receptor recombinante, en la célula puede llevarse a cabo utilizando cualquiera de una serie de vectores conocidos. Dichos vectores incluyen sistemas virales y no virales, incluidos los sistemas lentivirales y gammaretrovirales, así como sistemas basados en transposones, como PiggyBac o los sistemas de transferencia de genes basados en la Bella Durmiente. Los métodos ejemplares incluyen aquellos para la transferencia de ácidos nucleicos que codifican los receptores, incluyendo vía viral, *por ej.*, retroviral o lentiviral, transducción, transposones y electroporación.

[0499] En algunas divulgaciones, la transferencia de genes se logra estimulando primero la célula, por ejemplo, combinándola con un estímulo que induce una respuesta como la proliferación, la supervivencia y/o la activación, por ejemplo, medida por la expresión de una citocina o marcador de activación, seguida de la transducción de las células activadas y la expansión en cultivo hasta un número suficiente para aplicaciones clínicas.

[0500] En algunas divulgaciones, los ácidos nucleicos recombinantes se transfieren a las células utilizando partículas de virus infecciosos recombinantes, como, por ejemplo, vectores derivados del virus simio 40 (SV40), adenovirus, virus adeno-asociados (AAV) y virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). En algunas divulgaciones, los ácidos nucleicos recombinantes se transfieren a las células T utilizando vectores lentivirales recombinantes o vectores retrovirales, como los vectores gamma-retrovirales.

[0501] Se conocen métodos de transducción viral, por ejemplo, la transducción lentiviral. Se describen métodos ejemplares en, por ejemplo, Wang et al. (2012) J. Immunother. 35(9): 689-701; Cooper et al.

[0502] (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.

[0503] En algunas divulgaciones, la introducción se lleva a cabo poniendo en contacto una o más células de una composición con una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína recombinante, por ejemplo, el receptor recombinante. En algunas divulgaciones, el contacto puede efectuarse con centrifugación, como la espinoculación (por ejemplo, inoculación centrífuga). Dichos métodos incluyen cualquiera de los descritos en la publicación internacional número WO2016/073602. Las cámaras centrífugas ejemplares incluyen las producidas y vendidas por Biosafe SA, incluidas las que se utilizan con el sistema Sepax® y Sepax® 2, incluidas las cámaras centrífugas A-200/F y A-200 y diversos kits para su uso con dichos sistemas. Cámaras, sistemas e instrumentación de procesamiento y armarios ejemplares se describen, por ejemplo, en las Patentes de EE. UU. N.º 6,123,655, N.º 6,733,433 y Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. N.º 20160108061. US 2008/0171951, y solicitud de patente internacional publicada, publicación n.º. WO 00/38762. Entre los kits de un solo uso vendidos por BioSafe SA con los nombres de producto CS-430.1, CS-490.1, CS-600.1 o CS-900.2 se incluyen algunos ejemplos.

[0504] En algunas divulgaciones, el sistema se incluye con y/o se pone en asociación con otra instrumentación, incluyendo instrumentación para operar, automatizar, controlar y/o monitorizar aspectos del paso de transducción y uno o más varios otros pasos de procesamiento realizados en el sistema, por ejemplo, uno o más pasos de procesamiento que pueden llevarse a cabo con o en conexión con el sistema de cámara centrífuga como se describe en el presente documento o en el Número de Publicación Internacional WO2016/073602. En algunas divulgaciones, esta instrumentación se encuentra dentro de un armario. En algunas divulgaciones, la instrumentación incluye un gabinete, que incluye una carcasa que contiene circuitos de control, una centrífuga, una cubierta, motores, bombas, sensores, pantallas y una interfaz de usuario. En las patentes US 6.123.655, US 6.733.433 y US 2008/0171951 se describe un dispositivo ejemplar.

[0505] En algunas divulgaciones, el sistema comprende una serie de contenedores, por ejemplo, bolsas, tubos, llaves de paso, abrazaderas, conectores y una cámara centrífuga. En algunas divulgaciones, los contenedores, tales como bolsas, incluyen uno o más contenedores, tales como bolsas, que contienen las células a transducir y las partículas del vector viral, en el mismo contenedor o en contenedores separados, tales como la misma bolsa o bolsas separadas. En algunas divulgaciones, el sistema incluye además uno o más recipientes, como bolsas, que contienen medio, como diluyente y/o solución de lavado, que se introduce en la cámara y/o en otros componentes para diluir, resuspender y/o lavar componentes y/o composiciones durante los métodos. Los recipientes pueden conectarse en una o varias posiciones del sistema, como por ejemplo en una posición correspondiente a una línea de entrada, una línea de diluyente, una línea de lavado, una línea de residuos y/o una línea de salida.

[0506] En algunas divulgaciones, la cámara está asociada con una centrifugadora, que es capaz de efectuar la rotación de la cámara, tal como aproximadamente su eje de rotación. La rotación puede producirse antes, durante y/o después de la incubación en relación con la transducción de las células y/o en uno o más de los otros pasos de procesamiento. Por lo tanto, en algunas divulgaciones, uno o más de los diversos pasos de procesamiento se lleva a cabo bajo rotación, por ejemplo, a una fuerza particular. La cámara es típicamente capaz de rotación vertical o generalmente vertical, de tal manera que la cámara se asienta verticalmente durante la centrifugación y la pared lateral y el eje son verticales o

generalmente verticales, con la(s) pared(es) extrema(s) horizontal(es) o generalmente horizontal(es).

[0507] En algunas divulgaciones, la composición que contiene células, partículas virales y reactivo puede rotarse, generalmente a una fuerza o velocidad relativamente baja, tal como una velocidad inferior a la utilizada para granular las células, tal como desde o aproximadamente 600 rpm a 1700 rpm (por ejemplo, a o aproximadamente o al menos 600 rpm, 1000 rpm, o 1500 rpm o 1700 rpm). En algunas divulgaciones, la rotación se lleva a cabo con una fuerza, por ejemplo, una fuerza centrífuga relativa, de entre 100 g y 3200 g (por ejemplo, de entre 100 g, 200 g, 300 g, 400 g, 500 g, 1000 g, 1500 g, 2000 g, 2500 g, 3000 g o 3200 g), medida, por ejemplo, en una pared interna o externa de la cámara o cavidad. El término "fuerza centrífuga relativa" o RCF se entiende generalmente como la fuerza efectiva impartida sobre un objeto o sustancia (como una célula, muestra o gránulo y/o un punto de la cámara u otro recipiente que se hace girar), en relación con la fuerza gravitatoria terrestre, en un punto particular del espacio en comparación con el eje de rotación. El valor puede determinarse mediante fórmulas conocidas, teniendo en cuenta la fuerza gravitatoria, la velocidad de rotación y el radio de rotación (distancia entre el eje de rotación y el objeto, sustancia o partícula en la que se está midiendo la FCR).

[0508] En algunas divulgaciones, durante al menos una parte de la ingeniería genética, por ejemplo la transducción, y/o posteriormente a la ingeniería genética, las células se transfieren a un contenedor tal como una bolsa para el cultivo de las células genéticamente modificadas, tal como para el cultivo o expansión de las células, como se describió anteriormente. En algunas divulgaciones, el recipiente para el cultivo o expansión de las células es una bolsa biorreactora, como una bolsa de perfusión.

[0509] En algunas divulgaciones, los métodos divulgados incluyen uno o más pasos para cultivar células de ingeniería, por ejemplo, cultivar células bajo condiciones que promuevan la proliferación y/o expansión. En algunas divulgaciones, las células manipuladas se cultivan en condiciones que promueven la proliferación y/o expansión posterior a un paso de ingeniería genética, por ejemplo, la introducción de un polipéptido recombinante en las células por transducción o transfección. En divulgaciones particulares, las células se cultivan después de que las células se hayan incubado en condiciones estimulantes y se hayan transducido o transfectado con un polinucleótido recombinante, por ejemplo, un polinucleótido que codifica un receptor recombinante. En algunas divulgaciones, el cultivo produce una o más composiciones cultivadas de células T enriquecidas.

[0510] En algunas divulgaciones, el medio de cultivo es un medio de cultivo adaptado que soporta ese crecimiento, cultivo, expansión o proliferación de las células, tales como células T. En algunas divulgaciones, el medio puede ser un líquido que contiene una mezcla de sales, aminoácidos, vitaminas, azúcares o cualquier combinación de los mismos. En algunas divulgaciones, el medio de cultivo contiene además una o más condiciones o agentes estimulantes, como para estimular el cultivo, la expansión o la proliferación de las células durante la incubación. En algunas divulgaciones, la condición estimulante es o incluye una o más citocinas seleccionadas entre IL-2, IL-7 o IL-15. En algunas divulgaciones, la citocina es una citocina recombinante. En algunas divulgaciones, la concentración de la una o más citoquina en los medios de cultivo durante el cultivo o incubación, independientemente, es de o de aproximadamente 1 UI/mL a 1500 UI/mL, tal como de o de aproximadamente 1 UI/mL a 100 UI/mL, 2 UI/mL a 50 UI/mL, 5 UI/mL a 10 UI/mL, 10 UI/mL a 500 UI/mL, 50 UI/mL a 250 UI/mL o 100 UI/mL a 200 UI/mL, 50 UI/mL a 1500 UI/mL, 100 UI/mL a 1000 UI/mL o 200 UI/mL a 600 UI/mL. En algunas divulgaciones, la concentración de la una o más citocinas, independientemente, es de al menos o aproximadamente 1 UI/mL, 5 UI/mL, 10 UI/mL, 50 UI/mL, 100 UI/mL, 200 UI/mL, 500 UI/mL, 1000 UI/mL o 1500 UI/mL.

[0511] En algunas divulgaciones, las células se incuban durante al menos una porción de tiempo después de la transferencia de las células de ingeniería y los medios de cultivo. En algunas divulgaciones, las condiciones de estimulación generalmente incluyen una temperatura adecuada para el crecimiento de células inmunitarias primarias, tales como linfocitos T humanos, por ejemplo, al menos unos 25 grados Celsius, generalmente al menos unos 30 grados, y generalmente en o aproximadamente 37 grados Celsius. En algunas divulgaciones, las células se incuban a una temperatura de 25 a 38 grados Celsius, tal como 30 a 37 grados Celsius, por ejemplo a o aproximadamente 37 grados Celsius $\pm$ 2 grados Celsius. En algunas divulgaciones, la incubación se lleva a cabo durante un periodo de tiempo hasta que el cultivo, por ejemplo, el cultivo o la expansión, da lugar a una densidad, número o dosis de células deseada o umbral. En algunas divulgaciones, la incubación es mayor que o mayor que aproximadamente o es durante aproximadamente o 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días o más.

[0512] En algunas divulgaciones, las células se incuban bajo condiciones para mantener una cantidad objetivo de dióxido de carbono en el cultivo celular. En algunas divulgaciones, esto asegura un cultivo, expansión y proliferación óptimos de las células durante el crecimiento. En algunas divulgaciones, la cantidad de dióxido de carbono (CO₂) está entre 10% y 0% (v/v) de dicho gas, tal como entre 8% y 2% (v/v) de dicho gas, por ejemplo una cantidad de o aproximadamente 5% (v/v) de CO₂.

[0513] En algunas divulgaciones, las células se incuban utilizando contenedores, por ejemplo, bolsas, que se utilizan en conexión con un biorreactor. En algunos casos, el biorreactor puede estar sujeto a movimiento o balanceo, lo que, en algunas divulgaciones, puede aumentar la transferencia de oxígeno. El movimiento del biorreactor puede incluir, entre otros, la rotación a lo largo de un eje horizontal, la rotación a lo largo de un eje vertical, un movimiento de balanceo a lo largo de un eje horizontal inclinado del biorreactor o cualquier combinación de los mismos. En algunas divulgaciones, al menos una parte de la incubación se lleva a cabo con balanceo. La velocidad y el ángulo de balanceo pueden ajustarse para conseguir la agitación deseada. En algunas divulgaciones, el ángulo de la roca es o está aproximadamente 20°, 19°,

18°, 17°, 16°, 15°, 14°, 13°, 12°, 11°, 10°, 9°, 8°, 7°, 6°, 5°, 4°, 3°, 2° o 1°. En ciertas divulgaciones, el ángulo de la roca está entre 6-16°, inclusive. En otras divulgaciones, el ángulo de la roca está entre 7-16°. En otras divulgaciones, el ángulo de la roca está entre 8-12°, inclusive. En algunas divulgaciones, la velocidad de oscilación es de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 rpm. En algunas divulgaciones, la velocidad de oscilación está entre 4 y 12 rpm, tal como entre 4 y 6 rpm, inclusive. Al menos una parte de la expansión del cultivo celular se realiza con un movimiento de balanceo, tal como a un ángulo de entre 5° y 10°, inclusive, tal como 6°, a una velocidad de balanceo constante, tal como una velocidad de entre 5 y 15 RPM, inclusive, tal como 6 RMP o 10 RPM. Las células CD4+ y CD8+ se expanden por separado hasta que cada una de ellas alcanza una cantidad umbral o densidad celular.

[0514] En algunas divulgaciones, al menos una parte de la incubación se lleva a cabo en condiciones estáticas. En algunas divulgaciones, al menos una parte de la incubación se lleva a cabo con perfusión, como para perfundir los medios gastados y perfundir medios frescos durante el cultivo. En algunas divulgaciones, el método incluye un paso de perfusión de medio de cultivo fresco en el cultivo celular, tal como a través de un puerto de alimentación. En algunas divulgaciones, el medio de cultivo añadido durante la perfusión contiene uno o más agentes estimulantes, por ejemplo, una o más citocinas recombinantes, como IL-2, IL-7 y/o IL-15. En algunas divulgaciones, el medio de cultivo añadido durante la perfusión es el mismo medio de cultivo utilizado durante una incubación estática.

[0515] En algunas divulgaciones, después de la incubación, el contenedor, por ejemplo, la bolsa, se vuelve a conectar a un sistema para llevar a cabo uno o más pasos de procesamiento para fabricar, generar o producir la terapia celular, tal como se vuelve a conectar al sistema que contiene la cámara centrífuga. En algunas divulgaciones, las células cultivadas se transfieren de la bolsa a la cavidad interna de la cámara para la formulación de las células cultivadas.

[0516] En algunas divulgaciones, las células T se expanden añadiendo a una composición iniciadora de cultivo células alimentadoras, tales como células mononucleares de sangre periférica no divididas (PBMC), (*por ej.*, de tal manera que la población resultante de células contenga al menos aproximadamente 5, 10, 20, o 40 o más células alimentadoras PBMC por cada linfocito T en la población inicial a expandir); e incubando el cultivo (*por ej.*, durante un tiempo suficiente para expandir el número de células T). En algunas divulgaciones, las células alimentadoras que no se dividen pueden comprender células alimentadoras PBMC irradiadas con rayos gamma. En algunas divulgaciones, las PBMC se irradian con rayos gamma en el intervalo de aproximadamente 3000 a 3600 rads para prevenir la división celular. En algunas divulgaciones, las células alimentadoras se añaden al medio de cultivo antes de añadir las poblaciones de células T.

[0517] En algunas divulgaciones, las condiciones de estimulación incluyen una temperatura adecuada para el crecimiento de linfocitos T humanos, por ejemplo, al menos unos 25 grados Celsius, generalmente al menos unos 30 grados, y generalmente en o aproximadamente 37 grados Celsius. Opcionalmente, la incubación puede comprender además la adición de células linfoblastoides (LCL) no divididas transformadas por el EBV como células alimentadoras. El LCL puede irradiarse con rayos gamma en el intervalo de unos 6.000 a 10.000 rads. Las células alimentadoras LCL en algunas divulgaciones se proporcionan en cualquier cantidad adecuada, como una proporción de células alimentadoras LCL a linfocitos T iniciales de al menos aproximadamente 10:1.

[0518] En las divulgaciones, las células T específicas de antígeno, como las células T CD4+ y/o CD8+ específicas de antígeno, se obtienen estimulando linfocitos T ingenuos o específicos de antígeno con antígeno. Por ejemplo, se pueden generar líneas o clones de células T específicas para antígenos del citomegalovirus aislando células T de sujetos infectados y estimulando las células *in vitro* con el mismo antígeno.

[0519] En algunas divulgaciones, las células manipuladas se recogen, por ejemplo, se cosechan, para la formulación después de que las células han sido transducidas, transfectadas, cultivadas y/o expandidas. En algunas divulgaciones, las células se cosechan dentro de un periodo de tiempo, por ejemplo, en o dentro de 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, o 14 días, después del comienzo y/o inicio, o el final y/o finalización de un paso de procesamiento, como los pasos de aislamiento, selección, incubación, estimulación, activación, transducción, transfección, cultivo, y/o expansión. En ciertas divulgaciones, las células manipuladas se recogen después del cultivo, por ejemplo, en o dentro de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días o 10 días de cultivo y/o después de que las células manipuladas y/o las composiciones celulares que incluyen las células manipuladas se hayan expandido hasta un umbral de densidad celular, número celular y/o expansión. En algunas divulgaciones, las células cosechadas se formulan por cualquier método descrito en el presente documento, como por ejemplo como se describe en la Sección VI.

1. Reactivos estimulantes

[0520] En algunas divulgaciones, las células pueden ser incubadas y/o contactadas con un reactivo estimulante que es capaz de activar y/o expandir las células T. En ciertas divulgaciones, el reactivo estimulador comprende una partícula, por ejemplo, una perla, que está conjugada o unida a uno o más agentes, por ejemplo, biomoléculas, que son capaces de activar y/o expandir células, por ejemplo, células T. En algunas divulgaciones, uno o más agentes están unidos a una perla. En algunas divulgaciones, la microesfera es biocompatible, es decir, está compuesta de un material adecuado para uso biológico. En algunas divulgaciones, las microesferas no son tóxicas para las células cultivadas, por ejemplo, células T cultivadas. En algunas divulgaciones, las microesferas pueden ser cualquier partícula capaz de adherir agentes de

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

[0521] En algunas divulgaciones, un reactivo estimulante comprende uno o más agentes que son capaces de activar y/o expandir células, por ejemplo, células T, que están unidas o adheridas de otro modo a una microesfera, por ejemplo a la superficie de la microesfera. En ciertas divulgaciones, la perla es una partícula no celular. En divulgaciones particulares, la microesfera puede incluir una partícula coloidal, una microesfera, una nanopartícula, una microesfera magnética, o similares. En algunas divulgaciones, las perlas son perlas de agarosa. En ciertas divulgaciones, las perlas son perlas de sefarosa.

[0522] En divulgaciones particulares, el reactivo estimulante comprende microesferas que son monodispersas. En ciertas divulgaciones, las perlas que son monodispersas comprenden dispersiones de tamaño que tienen una desviación estándar de diámetro de menos del 5% entre sí.

[0523] En algunas divulgaciones, la microesfera contiene uno o más agentes, como un agente que está acoplado, conjugado o enlazado (directa o indirectamente) a la superficie de la microesfera. En algunas divulgaciones, un agente contemplado en el presente documento puede incluir, entre otros, ARN, ADN, proteínas (p. ej., enzimas), antígenos, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos, hidratos de carbono, lípidos, lectinas o cualquier otra biomolécula con afinidad por una diana deseada. En algunas divulgaciones, la diana deseada es un receptor de células T y/o un componente de un receptor de células T. En ciertas divulgaciones, la diana deseada es CD3. En cierta divulgación, la diana deseada es una molécula costimuladora, por ejemplo, CD28. Uno o más agentes pueden fijarse directa o indirectamente a la perla mediante diversos métodos conocidos y disponibles en la técnica. La unión puede ser covalente, no covalente, electrostática o hidrofóbica y puede llevarse a cabo por una variedad de medios de unión, incluyendo, por ejemplo, un medio químico, un medio mecánico o un medio enzimático. En algunas divulgaciones, una biomolécula (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD3 biotinilado) puede estar unida indirectamente a la microesfera a través de otra biomolécula (por ejemplo, un anticuerpo anti-biotina) que está unida directamente a la microesfera.

[0524] En algunas divulgaciones, uno o más de los agentes unidos a la microesfera es un anticuerpo. El anticuerpo puede incluir un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal (incluidos los anticuerpos de longitud completa que tienen una región Fc de inmunoglobulina), composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos y moléculas de cadena única, así como fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, F(ab')₂ y Fv). En algunas divulgaciones, el reactivo estimulante es un fragmento de anticuerpo (incluido el fragmento de unión a antígeno), por ejemplo, un fragmento Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, o (Fab')₂. Se apreciará que pueden utilizarse regiones constantes de cualquier isotipo para los anticuerpos contemplados en el presente documento, incluidas regiones constantes IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, y que dichas regiones constantes pueden obtenerse de cualquier especie humana o animal (por ejemplo, especies murinas). En algunas divulgaciones, el agente es un anticuerpo que se une a y/o reconoce uno o más componentes de un receptor de células T. En determinadas divulgaciones, el agente es un anticuerpo anti-CD3. En ciertas divulgaciones, el agente es un anticuerpo que se une a y/o reconoce un correceptor. En algunas divulgaciones, el reactivo estimulante comprende un anticuerpo anti-CD28.

[0525] En algunas divulgaciones, la perla tiene un diámetro de más de aproximadamente 0,001 µm, más de aproximadamente 0,01 µm, más de aproximadamente 0,1 µm, más de aproximadamente 1,0 µm, más de aproximadamente 10 µm, más de aproximadamente 50 µm, más de aproximadamente 100 µm o más de aproximadamente 1000 µm y no más de aproximadamente 1500µm. En algunas divulgaciones, la perla tiene un diámetro de aproximadamente 1,0 µm a aproximadamente 500 µm, de aproximadamente 1,0 µm a aproximadamente 150 µm, de aproximadamente 1,0 µm a aproximadamente 30 µm, de aproximadamente 1,0 µm a aproximadamente 10 µm, de aproximadamente 1,0 µm a aproximadamente 5,0 µm, de aproximadamente 2,0 µm a aproximadamente 5,0 µm, o de aproximadamente 3,0 µm a aproximadamente 5,0 µm. En algunas divulgaciones, la perla tiene un diámetro de aproximadamente 3 µm a aproximadamente 5µm. En algunas divulgaciones, la perla tiene un diámetro de al menos o aproximadamente 0,001 µm, 0,01 µm, 0,1µm, 0,5µm, 1,0 µm, 1,5 µm, 2,0 µm, 2,5 µm, 3,0 µm, 3,5 µm, 4,0 µm, 4,5 µm, 5,0 µm, 5,5 µm, 6,0 µm, 6,5 µm, 7,0 µm, 7,5 µm, 8,0 µm, 8,5 µm, 9,0 µm, 9,5 µm, 10 µm, 12 µm, 14 µm, 16 µm, 18 µm o 20 µm. En ciertas divulgaciones, la perla tiene un diámetro de o aproximadamente 4,5 µm. En ciertas divulgaciones, la perla tiene un diámetro de o aproximadamente 2,8 µm.

[0526] En algunas divulgaciones, las microesferas tienen una densidad superior a 0,001 g/cm³, superior a 0,01 g/cm³, superior a 0,05 g/cm³, superior a 0,1 g/cm³, superior a 0,5 g/cm³, superior a 0,6 g/cm³, superior a 0,7 g/cm³, superior a 0,8 g/cm³, superior a 0,9 g/cm³, superior a 1 g/cm³, superior a 1,1 g/cm³, superior a 1,2 g/cm³, superior a 1,3 g/cm³, superior a 1,4 g/cm³, superior a 1,5 g/cm³, superior a 2 g/cm³, superior a 3 g/cm³, superior a 4 g/cm³, o superior a 5g/cm³. En algunas divulgaciones, las perlas tienen una densidad de entre aproximadamente 0,001 g/cm³ y aproximadamente 100 g/cm³, aproximadamente 0,01 g/cm³ y aproximadamente 50 g/cm³, aproximadamente 0,1 g/cm³ y aproximadamente 10 g/cm³, aproximadamente 0,1 g/cm³ y aproximadamente 5 g/cm³, aproximadamente 0,5 g/cm³ y aproximadamente 1 g/cm³, aproximadamente 0,5 g/cm³ y aproximadamente 1,5 g/cm³, aproximadamente 1 g/cm³ y aproximadamente 1,5 g/cm³, aproximadamente 1 g/cm³ y aproximadamente 2 g/cm³, o aproximadamente 1 g/cm³ y aproximadamente 5 g/cm³, cada uno inclusive. En algunas divulgaciones, las perlas tienen una densidad de aproximadamente 0,5 g/cm³, aproximadamente 0,5 g/cm³, aproximadamente 0,6 g/cm³, aproximadamente 0,7 g/cm³, aproximadamente 0,8 g/cm³, aproximadamente 0,9 g/cm³, aproximadamente 1,0 g/cm³, aproximadamente 1,1 g/cm³, aproximadamente 1,2 g/cm³, aproximadamente 1,3 g/cm³, aproximadamente 1,4 g/cm³, aproximadamente 1,5 g/cm³, aproximadamente 1,6 g/cm³, aproximadamente 1,7

g/cm³, aproximadamente 1,8 g/cm³, aproximadamente 1,9 g/cm³, o aproximadamente 2,0 g/cm³. En ciertas divulgaciones, las perlas tienen una densidad de aproximadamente 1,6 g/cm³. En determinadas divulgaciones, las perlas o partículas tienen una densidad de aproximadamente 1,5 g/cm³. En ciertas divulgaciones, las partículas tienen una densidad de aproximadamente 1,3 g/cm³.

5

[0527] En ciertas divulgaciones, una pluralidad de perlas tiene una densidad uniforme. En ciertas divulgaciones, una densidad uniforme comprende una desviación estándar de la densidad de menos del 10%, menos del 5% o menos del 1% de la densidad media de la perla.

10

[0528] En algunas divulgaciones, las perlas tienen un área superficial de entre aproximadamente 0,001 m² por cada gramo de partículas (m²/g) y aproximadamente 1,000 m²/g, aproximadamente 0.010 m²/g y aproximadamente 100 m²/g, aproximadamente 0.1 m²/g y aproximadamente 10 m²/g, aproximadamente 0.1 m²/g y aproximadamente 1 m²/g, aproximadamente 1 m²/g y aproximadamente 10 m²/g, aproximadamente 10 m²/g y aproximadamente 100 m²/g, aproximadamente 0.5 m²/g y aproximadamente 20 m²/g, aproximadamente 0.5 m²/g y aproximadamente 5 m²/g, o aproximadamente 1 m²/g y aproximadamente 4 m²/g, cada uno inclusive. En algunas divulgaciones, las partículas o perlas tienen una superficie de aproximadamente 1m²/g a aproximadamente 4m²/g.

15

[0529] En algunas divulgaciones, la microesfera contiene al menos un material en o cerca de la superficie de la microesfera que puede acoplarse, enlazarse o conjugarse con un agente. En algunas divulgaciones, la microesfera está funcionalizada superficialmente, es decir, comprende grupos funcionales capaces de formar un enlace covalente con una molécula de unión, por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido. En divulgaciones particulares, la perla comprende grupos carboxilo, amino, hidroxilo, tosilato, epoxi y/o clorometilo expuestos a la superficie. En determinadas divulgaciones, las perlas comprenden agarosa y/o sefarosa expuestas a la superficie. En ciertas divulgaciones, la superficie de la microesfera comprende reactivos estimulantes unidos que pueden unir o adherir moléculas de unión. En determinadas divulgaciones, las biomoléculas son polipéptidos. En algunas divulgaciones, las perlas comprenden proteína A, proteína G o biotina expuestas a la superficie.

20

25

[0530] En algunas divulgaciones, la perla reacciona en un campo magnético. En algunas divulgaciones, la perla es una perla magnética. En algunas divulgaciones, la perla magnética es paramagnética. En determinadas divulgaciones, la perla magnética es superparamagnética. En ciertas divulgaciones, las perlas no muestran ninguna propiedad magnética a menos que se expongan a un campo magnético.

30

[0531] En divulgaciones particulares, la perla comprende un núcleo magnético, un núcleo paramagnético o un núcleo superparamagnético. En algunas divulgaciones, el núcleo magnético contiene un metal. En algunas divulgaciones, el metal puede ser, pero no se limita a, hierro, níquel, cobre, cobalto, gadolinio, manganeso, tantalio, zinc, circonio o cualquier combinación de los mismos. En ciertas divulgaciones, el núcleo magnético comprende óxidos metálicos (por ejemplo, óxidos de hierro), ferritas (por ejemplo, ferritas de manganeso, ferritas de cobalto, ferritas de níquel, etc.), hematitas y aleaciones metálicas (por ejemplo, CoTaZn). En algunas divulgaciones, el núcleo magnético comprende uno o más de una ferrita, un metal, una aleación de metales, un óxido de hierro o dióxido de cromo. En algunas divulgaciones, el núcleo magnético comprende hierro elemental o un compuesto del mismo. En algunas divulgaciones, el núcleo magnético comprende uno o más de magnetita (Fe₃O₄), maghemita (γFe₂O₃), o greigita (Fe₃S₄). En algunas divulgaciones, el núcleo interno comprende un óxido de hierro (por ejemplo, Fe₃O₄).

35

40

[0532] En ciertas divulgaciones, la perla contiene un núcleo magnético, paramagnético y/o superparamagnético que está cubierto por una capa o revestimiento funcionalizado superficialmente. En algunas divulgaciones, la capa puede contener un material que puede incluir, pero no se limita a, un polímero, un polisacárido, una sílice, un ácido graso, una proteína, un carbono, agarosa, sefarosa, o una combinación de los mismos. En algunas divulgaciones, el polímero puede ser un polietilenglicol, poli (ácido láctico-co-glicólico), poliglutaraldehído, poliuretano, poliestireno o un alcohol polivinílico. En ciertas divulgaciones, la capa o revestimiento exterior comprende poliestireno. En determinadas divulgaciones, el revestimiento exterior está funcionalizado superficialmente.

45

50

[0533] En algunas divulgaciones, el reactivo estimulador comprende una perla que contiene un núcleo de óxido metálico (por ejemplo, un núcleo de óxido de hierro) y un revestimiento, en el que el núcleo de óxido metálico comprende al menos un polisacárido (por ejemplo, dextrano), y en el que el revestimiento comprende al menos un polisacárido (por ejemplo, amino dextrano), al menos un polímero (por ejemplo, poliuretano) y sílice. En algunas divulgaciones, el núcleo de óxido metálico es un núcleo de óxido de hierro coloidal. En ciertas divulgaciones, el uno o más agentes incluyen un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. En divulgaciones particulares, el uno o más agentes incluyen un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28. En algunas divulgaciones, el reactivo estimulante comprende un anticuerpo anti-CD3, un anticuerpo anti-CD28 y un anticuerpo anti-biotina. En algunas divulgaciones, el reactivo estimulante comprende un anticuerpo anti-biotina. En algunas divulgaciones, la perla tiene un diámetro de aproximadamente 3 μm a aproximadamente 10 μm. En algunas divulgaciones, la perla tiene un diámetro de aproximadamente 3 μm a aproximadamente 5 μm. En ciertas divulgaciones, la perla tiene un diámetro de aproximadamente 3,5 μm.

55

60

[0534] En algunas divulgaciones, el reactivo estimulante comprende uno o más agentes que están unidos a una perla que comprende un núcleo de óxido metálico (por ejemplo, un núcleo interno de óxido de hierro) y un revestimiento (por ejemplo, un revestimiento protector), en el que el revestimiento comprende poliestireno. En ciertas divulgaciones, las perlas son

65

monodispersas, perlas superparamagnéticas que comprenden un núcleo de hierro superparamagnético, por ejemplo, un núcleo que comprende magnetita (Fe_3O_4) y/o maghemita ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$) c y una capa o recubrimiento de poliestireno. En algunas divulgaciones, la perla no es porosa. En algunas divulgaciones, las perlas contienen una superficie funcionalizada a la que se adhieren uno o más agentes. En ciertas divulgaciones, uno o más agentes están unidos covalentemente a las microesferas en la superficie. En algunas divulgaciones, el uno o más agentes incluyen un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunas divulgaciones, el uno o más agentes incluyen un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28. En ciertas divulgaciones, las perlas tienen una densidad de aproximadamente $1,5 \text{ g/cm}^3$ y un área superficial de aproximadamente $1 \text{ m}^2/\text{g}$ a aproximadamente $4 \text{ m}^2/\text{g}$. En divulgaciones particulares; las perlas son perlas superparamagnéticas monodispersas que tienen un diámetro de aproximadamente $4,5 \mu\text{m}$ y una densidad de aproximadamente $1,5 \text{ g/cm}^3$. En algunas divulgaciones, las microesferas son microesferas superparamagnéticas monodispersas que tienen un diámetro medio de aproximadamente $2,8 \mu\text{m}$ y una densidad de aproximadamente $1,3 \text{ g/cm}^3$.

15 E. Vectores y métodos de ingeniería genética

[0535] Los polinucleótidos (moléculas de ácido nucleico) que codifican los receptores recombinantes pueden incluirse en vectores para diseñar genéticamente células que expresen dichos receptores. En algunas divulgaciones, los vectores o construcciones contienen uno o más promotores unidos operativamente al nucleótido que codifica el polipéptido o receptor para dirigir la expresión del mismo. En algunas divulgaciones, el promotor está unido operativamente a una o más de una molécula de ácido nucleico.

[0536] En algunos casos, el vector es un vector viral, como un vector retroviral, por ejemplo, un vector lentiviral o un vector gammaretroviral. En algunas divulgaciones, el polinucleótido, como un vector, que codifica el receptor recombinante se introduce en una composición que contiene células cultivadas, como por transducción retroviral, transfección o transformación.

[0537] Varios métodos para la introducción de componentes genéticamente modificados, por ejemplo, receptores recombinantes, por ejemplo, CAR o TCR, son bien conocidos y pueden usarse con los métodos y composiciones divulgados. Los métodos ejemplares incluyen aquellos para la transferencia de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos o receptores, incluso a través de vectores virales, por ejemplo, retrovirales o lentivirales, vectores no virales o transposones, por ejemplo, el sistema de transposones de *la Bella Durmiente*. Los métodos de transferencia de genes pueden incluir la transducción, la electroporación u otro método que tenga como resultado la transferencia de genes a la célula.

[0538] En algunas divulgaciones, la transferencia de genes se logra estimulando primero la célula, por ejemplo, combinándola con un estímulo que induce una respuesta como la proliferación, la supervivencia y/o la activación, por ejemplo, medida por la expresión de una citocina o marcador de activación, seguida de la transducción de las células activadas y la expansión en cultivo hasta un número suficiente para aplicaciones clínicas.

[0539] En algunos contextos, puede ser deseable protegerse contra la posibilidad de que la sobreexpresión de un factor estimulante (por ejemplo, una linfoquina o una citoquina) pueda potencialmente dar lugar a un resultado no deseado o una menor eficacia en un sujeto, como un factor asociado con la toxicidad en un sujeto. Así, en algunos contextos, las células modificadas incluyen segmentos génicos que hacen que las células sean susceptibles a la selección negativa in vivo, como por ejemplo tras su administración en inmunoterapia adoptiva. Por ejemplo, en algunas divulgaciones, las células están diseñadas para que puedan eliminarse como resultado de un cambio en el estado in vivo del paciente al que se administran. El fenotipo seleccionable negativo puede resultar de la inserción de un gen que confiere sensibilidad a un agente administrado, por ejemplo, un compuesto. Los genes selectivos negativos incluyen el gen de la timidina quinasa del virus del herpes simple tipo I (HSV-I TK) (Wigler et al., Cell II :223, 1977) que confiere sensibilidad al ganciclovir; el gen de la hipoxantina fosfribosiltransferasa celular (HPRT), el gen de la adenina fosfribosiltransferasa celular (APRT), la citosina deaminasa bacteriana, (Mullen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:33 (1992)).

[0540] En algunas divulgaciones, los ácidos nucleicos recombinantes se transfieren a las células utilizando partículas de virus infecciosos recombinantes, como, por ejemplo, vectores derivados del virus simio 40 (SV40), adenovirus, virus adeno-asociados (AAV). En algunas divulgaciones, los ácidos nucleicos recombinantes se transfieren a las células T utilizando vectores lentivirales recombinantes o vectores retrovirales, como los vectores gamma-retrovirales (véase, por ejemplo, Koste et al. (2014) Gene Therapy 2014; Carlens et al. (2000) Exp Hematol 28(10): 1137-46; Alonso-Camino et al. (2013) Mol; Park et al., Trends Biotechnol. 2011 noviembre 29(11): 550-557.

[0541] En algunas divulgaciones, el polinucleótido que codifica el receptor recombinante y/o el polipéptido adicional está contenido en un vector o puede clonarse en uno o más vector(es). En algunas divulgaciones, el (los) uno o más vector(es) puede(n) utilizarse para transformar o transfectar una célula huésped, por ejemplo, una célula para ingeniería. Los vectores ejemplares incluyen vectores diseñados para la introducción, propagación y expansión o para la expresión o ambas, como plásmidos y vectores virales. En algunas divulgaciones, el vector es un vector de expresión, por ejemplo, un vector de expresión recombinante. En algunas divulgaciones, los vectores de expresión recombinantes pueden prepararse utilizando técnicas estándar de ADN recombinante.

- [0542]** En algunas divulgaciones, el vector puede ser un vector de la serie pUC (Fermentas Life Sciences), la serie pBluescript (Stratagene, La Jolla, Calif.), la serie pET (Novagen, Madison, Wis.), la serie pGEX (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia), o la serie pEX (Clontech, Palo Alto, Calif.). En algunos casos, también pueden utilizarse vectores bacteriófagos, como λ G10, λ GT11, λ ZapII (Stratagene), λ EMBL4 y λ NM1149. En algunas divulgaciones, se pueden utilizar vectores de expresión vegetal e incluyen pBI01, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 y pBIN19 (Clontech). En algunas divulgaciones, los vectores de expresión animal incluyen pEUK-CI, pMAM y pMAMneo (Clontech).
- [0543]** En algunas divulgaciones, el vector es un vector viral, tal como un vector retroviral. En algunas divulgaciones, el polinucleótido que codifica el receptor recombinante y/o polipéptido(s) adicional(es) se introducen en la célula a través de vectores retrovirales o lentivirales, o a través de transposones (véase, por ejemplo, Baum et al. (2006) *Terapia molecular: Revista de la Sociedad Americana de Terapia Génica*. 13:1050-1063; Frecha et al. (2010) *Molecular Therapy* 18:1748-1757; y Hackett et al. (2010) *Molecular Therapy* 18:674-683).
- [0544]** En algunas divulgaciones, las unidades de transcripción pueden ser diseñadas como una unidad bicistrónica que contiene un IRES, que permite la coexpresión de productos génicos (por ejemplo, codificando el receptor recombinante y el polipéptido adicional) por un mensaje de un solo promotor. Alternativamente, en algunos casos, un único promotor puede dirigir la expresión de un ARN que contenga, en un único marco abierto de lectura (ORF), dos o tres genes (por ejemplo, que codifiquen el marcador y que codifiquen el receptor recombinante) separados entre sí por secuencias que codifiquen un péptido de autolimpieza (por ejemplo, secuencias 2A) o un sitio de reconocimiento de proteasas (por ejemplo, furina). Así pues, el ORF codifica un único polipéptido que, ya sea durante (en el caso de 2A) o después de la traducción, se procesa en las proteínas individuales. En algunos casos, el péptido, como un T2A, puede hacer que el ribosoma se salte (ribosome skipping) la síntesis de un enlace peptídico en el C-terminal de un elemento 2A, lo que lleva a la separación entre el final de la secuencia 2A y el siguiente péptido aguas abajo (véase, por ejemplo, de Felipe, *Genetic Vaccines and Ther.* 2:13 (2004) and de Felipe et al. *Traffic* 5:616-626 (2004)). Se conocen varios elementos 2A. Ejemplos de secuencias 2A que pueden utilizarse en los métodos y el sistema aquí divulgados, sin limitación, secuencias 2A del virus de la fiebre aftosa (F2A, *por ej.*, SEQ ID N.º: 21), virus de la rinitis equina A (E2A, *por ej.*, SEQ ID N.º: 20), virus Thossea asigna (T2A, *por ej.*, SEQ ID N.º: 6 o 17), y teschovirus-1 porcino (P2A, *por ej.*, SEQ ID N.º: 18 o 19), tal como se describe en Pub. de Patente de EE.UU. Ser. 20070116690).
- [0545]** En algunas divulgaciones, el receptor recombinante, por ejemplo, un CAR, está bajo el control de un promotor. En algunas divulgaciones, el vector incluye un promotor. En algunas divulgaciones, el promotor es o comprende un promotor constitutivo. Los promotores constitutivos ejemplares incluyen, por ejemplo, el promotor temprano del virus simio 40 (SV40), el promotor temprano inmediato del citomegalovirus (CMV), el promotor humano de la ubiquitina C (UBC), el promotor humano del factor de elongación 1 α (EF1 α), el promotor de la fosfoglicerato quinasa 1 de ratón (PGK) y el promotor de la β -actina de pollo acoplado con el potenciador temprano del CMV (CAGG). En algunas divulgaciones, el promotor constitutivo es un promotor sintético o modificado. En algunas divulgaciones, el promotor es o comprende un promotor MND, un promotor sintético que contiene la región U3 de un LTR MoMuLV modificado con un potenciador del virus del sarcoma mieloproliferativo (véase Challita et al. (1995) *J. Virol.* 69(2):748-755). En algunas divulgaciones, el promotor es un promotor específico de tejido. En otra divulgación, el promotor es un promotor viral. En otra divulgación, el promotor es un promotor no viral. En algunas divulgaciones, los promotores ejemplares pueden incluir, entre otros, el promotor humano del factor de elongación 1 alfa (EF1 α) o una forma modificada del mismo o el promotor MND.
- [0546]** En algunas divulgaciones, el promotor es un promotor regulado (por ejemplo, promotor inducible). En algunas divulgaciones, el promotor es un promotor inducible o un promotor reprimible. En algunas divulgaciones, el promotor comprende una secuencia operadora Lac, una secuencia operadora de tetraciclina, una secuencia operadora de galactosa o una secuencia operadora de doxiciclina, o es un análogo de las mismas o es capaz de ser unido o reconocido por un represor Lac o un represor de tetraciclina, o un análogo de los mismos. En algunas divulgaciones, el polinucleótido no incluye un elemento regulador, por ejemplo, un promotor.
- [0547]** En algunos casos, la secuencia de ácido nucleico que codifica el receptor recombinante contiene una secuencia señal que codifica un péptido señal. En algunas divulgaciones, la secuencia señal puede codificar un péptido señal derivado de un polipéptido nativo. En otras divulgaciones, la secuencia señal puede codificar un péptido señal heterólogo o no nativo, como el péptido señal ejemplar de la cadena alfa de GMCSFR establecido en SEQ ID N.º:25 y codificado por la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID N.º:24. **[0389]** En algunos casos, la secuencia de ácido nucleico que codifica el receptor recombinante, por ejemplo, el receptor de antígeno quimérico (CAR), contiene una secuencia señal que codifica un péptido señal. Los péptidos señal ejemplares no limitantes incluyen, por ejemplo, el péptido señal de la cadena alfa GMCSFR establecido en SEQ ID N.º: 25 y codificada por la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID N.º:24, o el péptido señal CD8 alfa establecido en SEQ ID N.º:26.
- [0548]** En algunas divulgaciones, el polinucleótido contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica uno o más polipéptidos adicionales, por ejemplo, uno o más marcador(es) y/o una o más moléculas efectoras. En algunas divulgaciones, el (los) marcador(es) incluye(n) un marcador de transducción, un marcador sustituto y/o un marcador de selección. Entre las secuencias de ácido nucleico adicionales introducidas, por ejemplo, que codifican para uno o más polipéptido(s) adicional(es), se incluyen secuencias de ácido nucleico que pueden mejorar la eficacia de la terapia, por ejemplo, fomentando la viabilidad y/o función de las células transferidas; secuencias de ácido nucleico para proporcionar un marcador genético para la selección y/o evaluación de las células, por ejemplo, para evaluar la supervivencia o

localización *in vivo*; secuencias de ácido nucleico para mejorar la seguridad, por ejemplo, haciendo que la célula sea susceptible a la selección negativa *in vivo*, como se describe en 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 los documentos WO 1992008796 y WO 1994028143, en los que se describe el uso de genes de fusión seleccionables bifuncionales derivados de la fusión de un marcador seleccionable positivo dominante con un marcador seleccionable negativo, y la Patente de EE. UU. nº 6.040.177.

[0549] En algunas divulgaciones, un único promotor puede dirigir la expresión de un ARN que contenga, en un único marco de lectura abierto (ORF), dos o tres genes (*por ej.*, que codifiquen la molécula implicada en la modulación de una vía metabólica y que codifiquen el receptor recombinante) separados entre sí por secuencias que codifiquen un péptido de autolimpieza (*por ej.*, secuencias 2A) o un sitio de reconocimiento de proteasas (*por ej.*, furina). Así pues, el ORF codifica un único polipéptido que, ya sea durante (en el caso de 2A) o después de la traducción, se procesa en las proteínas individuales. En algunos casos, el péptido, como el T2A, puede hacer que el ribosoma se salte (ribosome skipping) la síntesis de un enlace peptídico en el C-terminal de un elemento 2A, lo que lleva a la separación entre el final de la secuencia 2A y el siguiente péptido aguas abajo (véase, por ejemplo, de Felipe. Genetic Vaccines and Ther. 2:13 (2004) y de Felipe et al. Traffic 5:616-626 (2004)). Se conocen muchos elementos de la 2A. Ejemplos de secuencias 2A que pueden utilizarse en los métodos y ácidos nucleicos aquí divulgados, sin limitación, secuencias 2A del virus de la fiebre aftosa (F2A, *por ej.*, SEQ ID N°: 22), virus de la rinitis equina A (E2A, *por ej.*, SEQ ID N°: 21), virus Thossea asigna (T2A, *por ej.*, SEQ ID N°: 6 o 18), y teschovirus-1 porcino (P2A, *por ej.*, SEQ ID N°: 19 o 20), tal como se describe en Publicación de patente de EE.UU. nº 20070116690.

[0550] En algunas divulgaciones, el vector contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica uno o más marcador(es). En algunas divulgaciones, el marcador o marcadores son marcadores de transducción, marcadores sustitutos y/o marcadores de selección.

[0551] En algunas divulgaciones, el marcador es un marcador de transducción o un marcador sustituto. Se puede utilizar un marcador de transducción o un marcador sustitutivo para detectar las células que han sido introducidas con el polinucleótido, por ejemplo, un polinucleótido que codifica un receptor recombinante. En algunas divulgaciones, el marcador de transducción puede indicar o confirmar la modificación de una célula. En algunas divulgaciones, el marcador sustitutivo es una proteína que se hace coexpresar en la superficie celular con el receptor recombinante, por ejemplo CAR. En divulgaciones particulares, dicho marcador sustituto es una proteína de superficie que ha sido modificada para tener poca o ninguna actividad. En ciertas divulgaciones, el marcador sustitutivo está codificado en el mismo polinucleótido que codifica el receptor recombinante. En algunas divulgaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica el receptor recombinante está unida de forma operable a una secuencia de ácido nucleico que codifica un marcador, opcionalmente separado por un sitio interno de entrada de ribosomas (IRES), o un ácido nucleico que codifica un péptido de autodestrucción o un péptido que provoca la omisión de ribosomas, como una secuencia 2A, como una T2A, una P2A, una E2A o una F2A. En algunos casos, pueden utilizarse genes marcadores extrínsecos en relación con la célula manipulada para permitir la detección o selección de células y, en algunos casos, también para promover el suicidio celular.

[0552] Los marcadores sustitutos ejemplares pueden incluir formas truncadas de polipéptidos de superficie celular, tales como formas truncadas que no son funcionales y no transducen o no son capaces de transducir una señal o una señal ordinariamente transducida por la forma de longitud completa del polipéptido de superficie celular, y/o no se internalizan o no son capaces de internalizarse. Los polipéptidos truncados de superficie celular ejemplares incluyen formas truncadas de factores de crecimiento u otros receptores, como un receptor truncado del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (tHER2), un receptor truncado del factor de crecimiento epidérmico (tEGFR, secuencia ejemplar de tEGFR expuesta en SEQ ID N°: 7 o 23) o un antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) o una forma modificada del mismo. El tEGFR puede contener un epítipo reconocido por el anticuerpo cetuximab (Erbix[®]) u otro anticuerpo terapéutico anti-EGFR o molécula de unión, que puede usarse para identificar o seleccionar células que han sido diseñadas con el constructo tEGFR y una proteína exógena codificada, y/o para eliminar o separar células que expresan la proteína exógena codificada. Véase Patente de EE.UU. nº 8.802.374 y Liu et al., Nature Biotech. 2016 April; 34(4): 430-434). En algunas divulgaciones, el marcador, *p. ej.*, marcador sustituto, incluye todo o parte (*p. ej.*, forma truncada) de CD34, un NGFR, un CD19 o un CD19 truncado, por ejemplo, un CD19 no humano truncado, o receptor del factor de crecimiento epidérmico (*p. ej.*, tEGFR).

[0553] En algunas divulgaciones, el marcador es o comprende una proteína fluorescente, como la proteína verde fluorescente (GFP), la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP), como la GFP superdobla (sfGFP), la proteína roja fluorescente (RFP), como tdTomato, mCherry, mStrawberry, AsRed2, DsRed o DsRed2, la proteína fluorescente cian (CFP), la proteína fluorescente verde azulada (BFP), la proteína fluorescente azulada mejorada (EBFP) y la proteína fluorescente amarilla (YFP), y sus variantes, incluidas las variantes de especie, las variantes monoméricas y las variantes optimizadas en codones y/o mejoradas de las proteínas fluorescentes. En algunas divulgaciones, el marcador es o comprende una enzima, como una luciferasa, el gen lacZ de *E. coli*, fosfatasa alcalina, fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP), cloranfenicol acetil transferasa (CAT). Algunos genes indicadores emisores de luz ejemplares son la luciferasa (luc), la β -galactosidasa, la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), la β -glucuronidasa (GUS) o sus variantes.

[0554] En algunas divulgaciones, el marcador es un marcador de selección. En algunas divulgaciones, el marcador de

selección es o comprende un polipéptido que confiere resistencia a agentes o fármacos exógenos. En algunas divulgaciones, el marcador de selección es un gen de resistencia a los antibióticos. En algunas divulgaciones, el marcador de selección es un gen de resistencia a antibióticos que confiere resistencia a antibióticos a una célula de mamífero. En algunas divulgaciones, el marcador de selección es o comprende un gen de resistencia a la Puromicina, un gen de resistencia a la Higromicina, un gen de resistencia a la Blasticidina, un gen de resistencia a la Neomicina, un gen de resistencia a la Geneticina o un gen de resistencia a la Zeocina o una forma modificada de los mismos.

[0555] En algunas divulgaciones, el vector retroviral tiene una secuencia de repetición terminal larga (LTR), por ejemplo, un vector retroviral derivado del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV), el virus del sarcoma mieloproliferativo (MPSV), el virus de células madre embrionarias murinas (MESV), el virus de células madre murinas (MSCV), el virus formador de focos en el bazo (SFFV) o el virus adenoasociado (AAV). La mayoría de los vectores retrovirales derivan de retrovirus murinos. En algunas divulgaciones, los retrovirus incluyen los derivados de cualquier fuente celular aviar o mamífera. Los retrovirus suelen ser anfitrópicos, lo que significa que son capaces de infectar células huésped de varias especies, incluida la humana. En una divulgación, el gen a expresar sustituye a las secuencias retrovirales gag, pol y/o env. Se han descrito varios sistemas retrovirales ilustrativos (por ejemplo, Pat. de 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.

[0556] Se conocen métodos de transducción lentiviral. Se describen métodos ejemplares 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 algunas divulgaciones, el polinucleótido que codifica el receptor recombinante y/o uno o más polipéptido(s) adicional(es) se introduce en una composición que contiene células cultivadas, como por transducción retroviral, transfección o transformación.

[0557] En algunas divulgaciones, los ácidos nucleicos recombinantes se transfieren a las células T mediante 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 algunas divulgaciones, los ácidos nucleicos recombinantes se transfieren a las células T mediante transposición (véase, por ejemplo, Manuri et al. (2010) *Hum Gene Ther* 21(4): 427-437; Sharma et al. (2013) *Molec.* y Huang et al. (2009) *Methods Mol Biol* 506: 115-126). Otros métodos para introducir y expresar material genético en células inmunitarias incluyen la transfección con fosfato cálcico (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 tungsteno (Johnston, *Nature*, 346: 776-777 (1990)); y coprecipitación de ADN con fosfato de estroncio (Brash et al., *Mol. Cell Biol.*, 7: 2031-2034 (1987)). En algunas divulgaciones, se realiza una etapa de lavado en una cámara centrífuga, por ejemplo las producidas y vendidas por Biosafe SA, incluidas las que se utilizan con el sistema Sepax® y Sepax® 2, incluidas las cámaras centrífugas A-200/F y A-200 de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0558] Otros enfoques y vectores para la transferencia de los ácidos nucleicos que codifican los productos recombinantes son los descritos, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional, Publicación N.º: WO2014055668, y Patente de EEUU N.º 7.446.190.

[0559] En algunas divulgaciones, las células, por ejemplo, células T, pueden ser transfectadas durante o después de la expansión, por ejemplo, con un receptor de células T (TCR) o un receptor de antígeno quimérico (CAR). Esta transfección para la introducción del gen del polipéptido o receptor deseado puede llevarse a cabo con cualquier vector retroviral adecuado, por ejemplo. A continuación, la población celular modificada genéticamente puede ser liberada del estímulo inicial (el estímulo CD3/CD28, por ejemplo) y posteriormente ser estimulada con un segundo tipo de estímulo (por ejemplo, a través de un receptor introducido de novo). Este segundo tipo de estímulo puede incluir un estímulo antigénico en forma de molécula de péptido/MHC, el ligando cognado (reticulado) del receptor introducido genéticamente (por ejemplo, el ligando natural de un CAR) o cualquier ligando (como un anticuerpo) que se una directamente dentro de la base del nuevo receptor (por ejemplo, reconociendo regiones constantes dentro del receptor). Véase, por ejemplo, Cheadle et al., "Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy" *Methods Mol Biol.* 2012; 907:645-66 o Barrett et al., *Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer Annual Review of Medicine* Vol. 65: 333-347 (2014).

[0560] Entre los ácidos nucleicos adicionales, por ejemplo, los genes para introducción son aquellos para mejorar la eficacia de la terapia, como por ejemplo 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, como por ejemplo 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 se describe por 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. en las que se describe el uso de genes de fusión seleccionables bifuncionales derivados de la fusión de un marcador seleccionable positivo dominante con un marcador seleccionable negativo. Véase, por ej., Riddell et al., Patente de EE- UU. N.º 6,040,177, en las columnas 14-17.

[0561] En algunas divulgaciones, las células son incubadas y/o cultivadas antes o en conexión con la ingeniería genética. Los pasos de incubación pueden incluir el cultivo, la estimulación, la activación y/o la propagación. La incubación y/o

ingeniería puede llevarse a cabo en un recipiente de cultivo, como una unidad, cámara, pocillo, columna, tubo, conjunto de tubos, válvula, vial, placa de cultivo, bolsa u otro recipiente para el cultivo o cultivo de células. En algunas divulgaciones, las composiciones o las células se incuban en presencia de condiciones estimulantes o de un agente estimulante. Dichas condiciones incluyen aquellas diseñadas para inducir la proliferación, expansión, activación y/o supervivencia de las células de la población, para imitar la exposición al antígeno y/o para preparar las células para la ingeniería genética, como por ejemplo para la introducción de un receptor de antígeno recombinante. En algunas divulgaciones, uno o más de los pasos de incubación pueden llevarse a cabo utilizando un biorreactor de balanceo, como el biorreactor WAVE™ (GE Healthcare) o el BIOSTAT® RM (Sartorius). En algunas divulgaciones, uno o más de los pasos de incubación pueden llevarse a cabo utilizando un biorreactor estático o una cámara de incubación. En divulgaciones específicas, puede añadirse a la composición un agente anticizallamiento, por ejemplo un poloxámero, si se utiliza un biorreactor basculante para uno o más pasos de incubación.

[0562] En algunos casos, se puede utilizar un vector que no requiera que las células, *por ej.*, las células T, estén activadas. En algunos de los casos aquí descritos, las células pueden seleccionarse y/o transducirse antes de la activación. Por lo tanto, las células pueden ser manipuladas antes o después del cultivo y, en algunos casos, al mismo tiempo o durante al menos una parte del cultivo.

[0563] Las condiciones pueden incluir uno o más de los medios particulares, temperatura, contenido de oxígeno, contenido de dióxido de carbono, tiempo, agentes, *por ej.*, nutrientes, aminoácidos, antibióticos, iones, y/o factores estimulantes, tales como citoquinas, quimioquinas, antígenos, socios de unión, proteínas de fusión, receptores solubles recombinantes, y cualquier otro agente diseñado para activar las células. En algunas divulgaciones, las células se incuban en presencia de una o más citoquinas y en algunas divulgaciones se puede emplear un cóctel de citoquinas, por ejemplo como se describe en la Solicitud de Patente Internacional Número de Publicación WO2015157384. En algunas divulgaciones, las células se incuban con una o más citocinas y/o un cóctel de citocinas antes, simultáneamente o después de la transducción.

[0564] En algunas divulgaciones, las condiciones o agentes estimulantes incluyen uno o más agentes, por ejemplo, ligando, que es capaz de activar un dominio de señalización intracelular de un complejo TCR. En algunas divulgaciones, el agente activa o inicia la cascada de señalización intracelular TCR/CD3 en una célula T. Dichos agentes pueden incluir anticuerpos, como los específicos para un componente del TCR, por ejemplo, anti-CD3. En algunas divulgaciones, las condiciones estimulantes incluyen uno o más agentes, por ejemplo, ligandos, que son capaces de estimular un receptor costimulador, por ejemplo, anti-CD28. En algunas divulgaciones, dichos agentes y/o ligandos pueden estar unidos a un soporte sólido, como una perla, y/o a una o más citocinas. Opcionalmente, el método de expansión puede comprender además el paso de añadir anticuerpos anti-CD3 y/o anti CD28 al medio de cultivo (por ejemplo, a una concentración de al menos aproximadamente 0,5 ng/ml). En algunas divulgaciones, los agentes estimulantes incluyen IL-2, y/o IL-15, por ejemplo, una concentración de IL-2 de al menos unas 10 unidades/mL. En ciertas divulgaciones, las condiciones de simulación incluyen la incubación con cualquier reactivo estimulante descrito en el presente documento, como los descritos en la Sección V-D-1.

[0565] En algunas divulgaciones, la incubación se lleva a cabo de acuerdo con técnicas como las descritas en la Patente de EE.UU. N.º 6.040.1 77 a 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 algunas divulgaciones, la transducción se lleva a cabo utilizando un sistema, dispositivo, aparato y/o método como los descritos en la solicitud de patente internacional número de publicación WO2016/073602 o US 2016/0122782. En algunas divulgaciones, la transducción se lleva a cabo según los métodos descritos en la solicitud de patente internacional número de publicación WO 2015/164675.

[0566] En algunas divulgaciones, las células T se expanden añadiendo a una composición iniciadora de cultivo células alimentadoras, tales como células mononucleares de sangre periférica no divididas (PBMC), (*por ej.*, de tal manera que la población resultante de células contenga al menos aproximadamente 5, 10, 20, o 40 o más células alimentadoras PBMC por cada linfócito T en la población inicial a expandir); e incubando el cultivo (*por ej.*, durante un tiempo suficiente para expandir el número de células T). En algunas divulgaciones, las células alimentadoras que no se dividen pueden comprender células alimentadoras PBMC irradiadas con rayos gamma. En algunas divulgaciones, las PBMC se irradian con rayos gamma en el intervalo de aproximadamente 3000 a 3600 rads para prevenir la división celular. En algunas divulgaciones, las células alimentadoras se añaden al medio de cultivo antes de añadir las poblaciones de células T.

[0567] En algunas divulgaciones, las condiciones de estimulación incluyen una temperatura adecuada para el crecimiento de linfocitos T humanos, por ejemplo, al menos unos 25 grados Celsius, generalmente al menos unos 30 grados, y generalmente en o aproximadamente 37 grados Celsius. Opcionalmente, la incubación puede comprender además la adición de células linfoblastoides (LCL) no divididas transformadas por el EBV como células alimentadoras. El LCL puede irradiarse con rayos gamma en el intervalo de unos 6.000 a 10.000 rads. Las células alimentadoras LCL en algunas divulgaciones se proporcionan en cualquier cantidad adecuada, como una proporción de células alimentadoras LCL a linfocitos T iniciales de al menos aproximadamente 10:1.

[0568] En algunas divulgaciones, los métodos de preparación incluyen pasos para congelar, *por ej.*, criopreservar, las células, ya sea antes o después del aislamiento, incubación y/o ingeniería. En algunas divulgaciones, el paso de congelación y posterior descongelación elimina los granulocitos y, en cierta medida, los monocitos de la población celular.

En algunas divulgaciones, las células se suspenden en una solución de congelación, por ejemplo, después de una etapa de lavado para eliminar el plasma y las plaquetas. Puede utilizarse cualquiera de las diversas soluciones y parámetros de congelación conocidos en algunas divulgaciones. Un ejemplo consiste en utilizar PBS que contenga un 20% de DMSO y un 8% de albúmina sérica humana (HSA), u otros medios de congelación celular adecuados. A continuación, se diluye 1:1 con los medios de forma que la concentración final de DMSO y HSA sea del 10% y 4%, respectivamente. A continuación, las células se congelan generalmente a -80° C. a un ritmo de 1° por minuto y se almacenan en la fase de vapor de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido. En algunas divulgaciones, la composición se encierra en una bolsa adecuada para la criopreservación (por ejemplo, CryoMacs® Freezing Bags, Miltenyi Biotec). En algunas divulgaciones, la composición se encierra en un vial adecuado para la criopreservación (por ejemplo, CellSeal® Vials, Cook Regentec).

En algunas divulgaciones, los pasos y/o reactivos para la congelación son o incluyen cualquiera de los pasos y/o reactivos para la congelación que se describen en el presente documento.

[0569] En divulgaciones particulares, las células se congelan, por ejemplo, después de una etapa de lavado, por ejemplo, para eliminar el plasma y las plaquetas... En algunas divulgaciones, las células se congelan antes, después y/o durante cualquiera de los pasos asociados con la fabricación y/o generación de células, por ejemplo, células T CD4+ y/o CD8+, que expresan un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR. En ciertas divulgaciones, dichos pasos pueden incluir cualquier paso asociado con la generación de células de ingeniería, incluyendo pero sin limitarse a, la selección y/o aislamiento de un subconjunto de células, por ejemplo, células T CD4+ y/o CD8+, la estimulación y/o expansión de células, por ejemplo, células T o un subconjunto de las mismas, o la transfección o transducción de las células. En algunas divulgaciones, las células son células de una muestra de aféresis recogida de un sujeto, antes de la selección y/o aislamiento de las células, la estimulación y/o expansión de las células, o la transfección o transducción de las células. En divulgaciones particulares, las células se congelan después de la finalización de un proceso de ingeniería, por ejemplo, después de un proceso que incluye uno o más pasos de aislamiento, selecciones, estimulación, activación, transducción, transfección y/o expansión.

[0570] En algunas divulgaciones, las células se suspenden en una solución de congelación, por ejemplo, un crioprotector y/o una solución que contiene un crioprotector. Puede utilizarse cualquiera de las diversas soluciones y parámetros de congelación conocidos en algunas divulgaciones, incluidas las soluciones de congelación que contienen medio de criopreservación o vitrificación o soluciones que contienen crioprotector. Los crioprotectores adecuados incluyen, entre otros, dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, un glicol, un propilenglicol, un etilenglicol, propanodiol, polietilenglicol (PEG), 1, 2-propanodiol (PROH) o una mezcla de los mismos. En algunas divulgaciones, la solución de criopreservación puede contener uno o más criopreservantes no permeables a las células, incluyendo pero no limitado a, polivinilpirrolidona, un hidroxietilalmidón, un polisacárido, un monosacárido, un alginato, trehalosa, rafinosa, dextrano, albúmina de suero humano, Ficoll, lipoproteínas, polivinilpirrolidona, hidroxietilalmidón, plasma autólogo o una mezcla de los mismos. En algunas divulgaciones, las células se suspenden en una solución de congelación con una concentración final de crioprotector de entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 20%, entre aproximadamente el 3% y aproximadamente el 9%, o entre aproximadamente el 6% y aproximadamente el 9% en volumen, cada uno inclusive. En ciertas divulgaciones, la concentración final de crioprotector en la solución de congelación es de aproximadamente 3%, aproximadamente 4%, aproximadamente 5%, aproximadamente 5,5%, aproximadamente 6%, aproximadamente 6,5%, aproximadamente 7%, aproximadamente 7,5%, aproximadamente 8%, aproximadamente 8,5%, aproximadamente 9%, aproximadamente 9,5% o aproximadamente 10% en volumen.

[0571] En algunas divulgaciones, las células, por ejemplo, se congelan a una densidad celular particular, por ejemplo, una densidad celular conocida o controlada. En ciertas divulgaciones, la densidad celular durante el proceso de congelación puede afectar a la muerte celular y/o al daño celular que se produce durante y/o debido al proceso de congelación.

[0572] Por ejemplo, en divulgaciones particulares, la densidad celular afecta el equilibrio, por ejemplo, el equilibrio osmótico, con los alrededores durante el proceso de congelación. En algunas divulgaciones, este equilibrio es, incluye y/o resulta en deshidratación. En ciertas divulgaciones, la deshidratación es o incluye deshidratación celular que ocurre con contacto, combinación, y/o incubación con una solución congelante, por ejemplo, DMSO y/o una solución que contenga DMSO. En divulgaciones particulares, la deshidratación es o incluye la deshidratación resultante de la nucleación y agrandamiento de cristales de hielo en el espacio extracelular, como por ejemplo reduciendo la concentración efectiva de agua líquida expuesta a las células. En algunas divulgaciones, las células se congelan a una densidad celular que resulta en una deshidratación más lenta y/o menos rápida que las células que se congelan a una densidad celular diferente, por ejemplo, mayor o menor. En algunas divulgaciones, las células se congelan a una densidad celular que resulta en una deshidratación aproximadamente, al menos, o al 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 50 o 100 veces más lenta que las células congeladas a una densidad celular diferente, por ejemplo, mayor o menor, en condiciones iguales o similares.

[0573] En algunas divulgaciones, el crioprotector es DMSO. En divulgaciones particulares, las células se suspenden en una solución de congelación con una concentración final de DMSO de entre aproximadamente 1% y aproximadamente 20%, entre aproximadamente 3% y aproximadamente 9%, o entre aproximadamente 6% y aproximadamente 9% en volumen, cada uno inclusive. En ciertas divulgaciones, la concentración final de DMSO en la solución de congelación es de aproximadamente 3%, aproximadamente 4%, aproximadamente 5%, aproximadamente 5,5%, aproximadamente 6%, aproximadamente 6,5%, aproximadamente 7%, aproximadamente 7,5%, aproximadamente 8%, aproximadamente 8,5%, aproximadamente 9%, aproximadamente 9,5% o aproximadamente 10% en volumen.

- 5 **[0574]** En divulgaciones particulares, las células se suspenden en una solución de congelación a una densidad de entre o entre aproximadamente $0,1 \times 10^6$ células/ mL y aproximadamente $5,000 \times 10^6$ células/ mL, entre o entre aproximadamente 1×10^6 células/ mL y aproximadamente 500×10^6 células/ mL, entre o entre aproximadamente 5×10^6 células/ mL y aproximadamente 150×10^6 células/ mL, entre o entre aproximadamente 10×10^6 células/ mL y aproximadamente 70×10^6 células/ mL, o entre o entre aproximadamente 15×10^6 células/ mL y aproximadamente 60×10^6 células/ mL, cada uno inclusive. En algunas divulgaciones, las células son células viables.
- 10 **[0575]** En ciertas divulgaciones, las células se suspenden en una solución de congelación a una densidad de entre o entre aproximadamente 1×10^6 células/ mL y aproximadamente 1×10^8 células/ mL, entre aproximadamente 1×10^6 células/ mL y aproximadamente 1×10^7 células/ mL, entre aproximadamente 1×10^7 células/ mL y aproximadamente 5×10^7 células/ mL, o entre aproximadamente 1×10^7 células/ mL y 5×10^7 células/ mL, cada uno inclusive. En determinadas divulgaciones, las células se suspenden en la solución de congelación a una densidad de aproximadamente 1×10^6 células/ mL, aproximadamente 2×10^6 células/ mL, aproximadamente 5×10^6 células/ mL, aproximadamente 1×10^7 células/ mL, aproximadamente $1,5 \times 10^7$ células/ mL, aproximadamente 2×10^7 células/ mL, aproximadamente $2,5 \times 10^7$ células/ mL, aproximadamente 3×10^7 células/ mL, aproximadamente $3,5 \times 10^7$ células/ mL, aproximadamente 4×10^7 células/ mL, aproximadamente $4,5 \times 10^7$ células/ mL, o aproximadamente 5×10^7 células/ mL, cada uno inclusive. En ciertas divulgaciones, las células se suspenden en la solución de congelación a una densidad de entre aproximadamente $1,5 \times 10^7$ células/ mL y aproximadamente 6×10^7 células/ mL, inclusive. En ciertas divulgaciones, las células se suspenden en una solución de congelación a una densidad de al menos aproximadamente 1×10^7 células/ mL. En determinadas divulgaciones, las células se suspenden en una solución de congelación a una densidad de al menos aproximadamente $1,5 \times 10^7$ células/ mL. En algunas divulgaciones, las células son células viables.
- 25 **[0576]** En algunas divulgaciones, las células se congelan en un recipiente. En ciertas divulgaciones, el recipiente es un recipiente de congelación y/o un recipiente crioprotector. Los recipientes adecuados para la criocongelación incluyen, entre otros, viales, bolsas, por ejemplo, de plástico, y bastones. En divulgaciones particulares, las células, por ejemplo, células de la misma composición celular tal como una composición celular que contiene células que expresan CAR, se congelan en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 10, o más de 10 recipientes separados. Por ejemplo, en algunas divulgaciones, las células y/o una composición de células se suspenden en un volumen, por ejemplo, como en una solución, una solución de congelación y/o un crioprotector, y que es mayor que un volumen adecuado para un recipiente, por lo que el volumen se coloca en dos o más recipientes. En algunas divulgaciones, el volumen es, es aproximadamente, o inferior a 100 mL, 50 mL, 25 mL, 20 mL, 15 mL, 10 mL, 5 mL, o menos de 5 mL, y las células se congelan en dos, tres, cuatro, cinco seis, siete, ocho, nueve, diez, o más de diez viales separados. En determinadas divulgaciones, se coloca el mismo volumen de células en cada vial. En algunas divulgaciones, los viales son viales idénticos, por ejemplo, viales de la misma marca, modelo y/o lote de fabricación. En divulgaciones particulares, el volumen es, es aproximadamente, o mayor que 10 mL, 15 mL, 20 mL, 25 mL, 30 mL, 40 mL, 50 mL, 60 mL, 70 mL, 80 mL, 90 mL, 100 mL, 120 mL, 150 mL, 200 mL, o más de 200 mL y las células se congelan en dos, tres, cuatro, cinco seis, siete, ocho, nueve, diez, o más de diez bolsas separadas. En determinadas divulgaciones, se coloca el mismo volumen de células en cada bolsa. En algunas divulgaciones, las bolsas son bolsas idénticas, por ejemplo, bolsas de la misma marca, modelo y/o lote de fabricación.
- 30 **[0577]** En algunas divulgaciones, el contenedor es un vial. En ciertas divulgaciones, el recipiente es un vial con un volumen de llenado de, de aproximadamente, o de al menos 0,5 mL. 5 mL, 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, 7 mL, 8 mL, 9 mL, 10 mL, 11 mL, 12 mL, 13 mL, 14 mL, 15 mL, 16 mL, 17 mL, 18 mL, 19 mL, 20 mL, 25 mL, 30 mL, 35 mL, 40 mL, 45 mL, o 50 mL. En algunas divulgaciones, el vial tiene un volumen de llenado de entre 1 mL y 120 mL, 1 mL y 20 mL, 1 mL y 5 mL, 1 mL y 10 mL, 1 mL y 40 mL, o 20 mL y 40 mL, cada uno inclusive. En algunas divulgaciones, el vial es un vial de congelación, un vial crioprotector y/o un criovial. Los viales adecuados son conocidos e incluyen, entre otros, los viales CellSeal® (Cook Regentec) y los viales descritos en la Patentes de EE.UU. N.º US 8.936.905, US 9.565.854 y US 8.709.797.
- 35 **[0578]** En determinadas divulgaciones, el contenedor es una bolsa. En ciertas divulgaciones, el recipiente es una bolsa con un volumen de llenado de, de aproximadamente, o de al menos 0.5 ml, 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml, 11 ml, 12 ml, 13 ml, 14 ml, 15 ml, 16 ml, 17 ml, 18 ml, 19 ml, 20 ml, 25 ml, 30 ml, 35 ml, 40 ml, 45 ml o 50 ml. En algunas divulgaciones, la bolsa tiene un volumen de llenado de entre 1 mL y 120 mL, 1 mL y 20 mL, 1 mL y 5 mL, 1 mL y 40 mL, 20 mL y 40 mL, 1 mL y 70 mL, o 50 mL y 70 mL, cada uno inclusive. En algunas divulgaciones, la bolsa se llena con un volumen de, aproximadamente, o inferior a 100 mL, 75 mL, 70 mL, 50 mL, 25 mL, 20 mL o 10 mL. Las bolsas adecuadas son conocidas, e incluyen pero no se limitan a las bolsas de congelación CryoMacs® (Miltenyi Biotec). En ciertas divulgaciones, el volumen es el volumen a temperatura ambiente. En algunas divulgaciones, el volumen es el volumen entre 37°C y 4°C, 16°C y 27°C, inclusive, o en, aproximadamente, o al menos 16°C, 17°C, 18°C, 19°C, 20°C, 21°C, 22°C, 23°C, 24°C, 25°C, 26°C, 27°C, 28°C, 29°C, 30°C, 31°C, 32°C, 33°C, 34°C, 35°C, 36°C, o 37°C. En algunas divulgaciones, el volumen es el volumen a 25°C.
- 40 **[0579]** En algunas divulgaciones, las células en un volumen de medio o solución, por ejemplo, solución de congelación, de entre 1 mL y 20 mL se congelan en uno o más viales, inclusive. En algunas divulgaciones, el uno o más viales tienen un volumen de llenado de entre 1 mL y 5 mL, inclusive. En ciertas divulgaciones, las células en un volumen de medio o solución, por ejemplo, solución de congelación, de entre 20 mL y 120 mL, inclusive, se congelan en una o más bolsas. En

determinadas divulgaciones, la una o más bolsas tienen un volumen de llenado de entre 20 mL y 40 mL, ambos inclusive. En algunas divulgaciones, las células en un volumen de medio o solución, por ejemplo, solución de congelación, de 120 mL o más se congelan en una o más bolsas. En ciertas divulgaciones, la una o más bolsas tienen un volumen de llenado de entre 50 mL y 70 mL, inclusive.

[0580] En ciertas divulgaciones, las células se congelan en una solución, p. ej., una solución de congelación, que se coloca en un recipiente, p. ej., una bolsa o un vial, en una relación superficie/volumen. En determinadas divulgaciones, la relación superficie/volumen es de o aproximadamente 0.1 cm^{-1} to 100 cm^{-1} ; 1 cm^{-1} a 50 cm^{-1} , 1 cm^{-1} a 20 cm^{-1} , 1 cm^{-1} a 10 cm^{-1} , 2 cm^{-1} a 10 cm^{-1} , 3 cm^{-1} a 7 cm^{-1} , o 3 cm^{-1} a 6 cm^{-1} , cada uno inclusive. En determinadas divulgaciones, la relación superficie/volumen está comprendida entre 3 cm^{-1} y 6 cm^{-1} , aproximadamente. En algunas divulgaciones, la relación área superficial/volumen es, es aproximadamente, o es al menos 3 cm^{-1} , 4 cm^{-1} , 5 cm^{-1} , 6 cm^{-1} , o 7 cm^{-1} .

[0581] En algunas divulgaciones, la transferencia al medio de criopreservación se asocia con uno o más pasos de procesamiento que pueden implicar el lavado de la muestra, por ejemplo, la composición de células de ingeniería, como para eliminar el medio y/o reemplazar las células en un tampón o medio de criopreservación apropiado para su posterior congelación. En ciertas divulgaciones, la transferencia al medio de criopreservación está totalmente automatizada a escala clínica en un sistema cerrado y estéril. En ciertas divulgaciones, la transferencia al medio de criopreservación se realiza utilizando el sistema CliniMACS (Miltenyi Biotec).

[0582] En algunas divulgaciones, las células se descongelan. En determinadas divulgaciones, las células se descongelan rápidamente, por ejemplo, tan rápidamente como sea posible sin sobrecalentar las células o exponerlas a altas temperaturas, como por encima de 37°C . En algunas divulgaciones, la descongelación rápida reduce y/o evita la exposición de las células a altas concentraciones de crioprotector y/o DMSO. En determinadas divulgaciones, la velocidad a la que se produce la descongelación puede verse afectada por las propiedades del recipiente, por ejemplo, el vial y/o la bolsa, en el que se congelan y descongelan las células. En divulgaciones particulares, las células se descongelan a una temperatura de, de aproximadamente, o inferior a 37°C , 35°C , 32°C , 30°C , 29°C , 28°C , 27°C , 26°C , 25°C , 24°C , 23°C , 22°C , 21°C , 20°C , o 15°C , o entre 15°C y 30°C , entre 23°C y 28°C , o entre 24°C y 26°C , cada uno inclusive. En algunas divulgaciones, las células se descongelan en un bloque térmico o en un baño de agua. En ciertas divulgaciones, las células no se descongelan en un bloque térmico o baño de agua. En algunas divulgaciones, las células se descongelan a temperatura ambiente. En algunas divulgaciones, el grosor de las paredes del recipiente afecta a la velocidad de descongelación de las células, como por ejemplo las células en recipientes con paredes gruesas se descongelan a una velocidad más lenta que en recipientes con paredes más finas. En algunas divulgaciones, los recipientes que tienen una baja relación superficie/volumen tienen una velocidad de descongelación lenta y/o desigual. En algunas divulgaciones, las células criocongeladas se descongelan rápidamente en un contenedor cuya relación área superficial/volumen es, es aproximadamente, o es de al menos 1 cm^{-1} , 2 cm^{-1} , 3 cm^{-1} , 4 cm^{-1} , 5 cm^{-1} , 6 cm^{-1} , o 7 cm^{-1} , 8 cm^{-1} , 9 cm^{-1} , o 10 cm^{-1} . En determinadas divulgaciones, las células se descongelan en, aproximadamente, o en menos de 120 minutos, 90 minutos, 60 minutos, 45 minutos, 30 minutos, 25 minutos, 20 minutos, 15 minutos o diez minutos. En algunas divulgaciones, las células se descongelan entre 10 minutos y 60 minutos, 15 minutos y 45 minutos, o 15 minutos y 25 minutos, cada uno inclusive. En determinadas divulgaciones, las células se descongelan en, aproximadamente, o en menos de 20 minutos.

[0583] En ciertas divulgaciones, las células descongeladas son reposadas, por ejemplo, incubadas o cultivadas, antes de la administración o antes de cualquier paso subsiguiente de ingeniería y/o procesamiento. En algunas divulgaciones, las células se reposan en cantidades bajas y/o indetectables de crioprotector, o en ausencia de crioprotector, por ejemplo, DMSO. En determinadas divulgaciones, las células descongeladas se dejan reposar después o inmediatamente después de los pasos de lavado, por ejemplo, para eliminar el crioprotector y/o el DMSO. En algunas divulgaciones, el reposo es o incluye cultivo y/o incubación a o aproximadamente 37°C . En algunas divulgaciones, el reposo se realiza en ausencia de cualquier reactivo, por ejemplo, reactivos estimuladores, reactivos de microesferas o citoquinas recombinantes, utilizados con y/o asociados con cualquier paso de procesamiento o ingeniería. En algunas divulgaciones, las células se dejan reposar durante, aproximadamente o al menos 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 18 horas o 24 horas. En determinadas divulgaciones, las células se dejan reposar durante, aproximadamente o al menos 2 horas.

[0584] En algunas divulgaciones, las células son congeladas, por ejemplo, criopreservadas, ya sea antes, durante o después de dichos métodos de procesamiento y/o ingeniería de las células. En algunas divulgaciones, el paso de congelación y posterior descongelación elimina los granulocitos y, en cierta medida, los monocitos de la población celular. A continuación, las células se congelan generalmente a -80°C . a un ritmo de 1° por minuto y se almacenan en la fase de vapor de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido. En algunas divulgaciones, las células se enfrían activa y/o eficazmente a una velocidad de o de aproximadamente 1° por minuto utilizando un congelador de velocidad controlada. En algunas divulgaciones, las células pueden congelarse con un congelador de velocidad controlada. En algunas divulgaciones, los congeladores de velocidad controlada se utilizan para congelar células con perfiles de enfriamiento programados, por ejemplo, perfiles con múltiples velocidades de enfriamiento y/o calentamiento. Dichos perfiles de congelación pueden programarse para controlar la nucleación, por ejemplo, la formación de hielo, por ejemplo para reducir la formación de hielo intracelular.

[0585] En algunas divulgaciones, las características de las células congeladas que incluyen cualquiera de las células y composiciones descritas, tales como composiciones celulares a una concentración o densidad celular particular,

congeladas en presencia de un crioprotector y/o llenadas en un recipiente a un volumen o relación superficie/volumen particular, incluyen expansión mejorada, aumentada y/o más rápida; supervivencia celular mejorada, aumentada y/o aumentada y casos reducidos de muerte celular, p. ej., necrosis, muerte celular programada, y/o apoptosis; actividad mejorada, aumentada, y/o incrementada, por ejemplo, actividad citolítica; y/o casos reducidos de senescencia o quiescencia tras la descongelación que las células congeladas por medios alternativos.

[0586] En divulgaciones particulares, las células se congelan a una densidad celular y/o a una relación superficie/volumen divulgada en el presente documento y tienen muerte celular reducida, por ejemplo, necrosis y/o apoptosis, durante y/o como resultado de la congelación, criocongelación, y/o criopreservación, en comparación con células congeladas a una densidad celular diferente y/o a una relación superficie/volumen diferente bajo las mismas o similares condiciones. En divulgaciones particulares, las células se congelan a una densidad celular y/o a una relación superficie/volumen divulgada en el presente documento y presentan una reducción de la muerte celular retardada, por ejemplo, una reducción de la cantidad de células que mueren, por ejemplo, por necrosis, muerte celular programada o apoptosis, en un plazo de 48 horas después de la congelación, criocongelación y/o criopreservación, por ejemplo, después de la descongelación de las células congeladas. En ciertas divulgaciones, al menos o aproximadamente un 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 99% menos de células mueren durante y/o como resultado de la congelación y/o criopreservación en comparación con células que se congelan a una densidad celular diferente y/o a una relación superficie/volumen diferente en las mismas o similares condiciones. En ciertas divulgaciones, menos del 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 1%, 0,1% o 0,01% de las células congeladas a la densidad celular divulgada y/o a una relación superficie/volumen mueren durante o como resultado de la congelación, criocongelación y/o criopreservación.

[0587] En algunas divulgaciones, las células se congelan a una densidad celular y/o a una relación superficie/volumen divulgada en el presente documento y presentan casos reducidos de senescencia o quiescencia debido a y/o como resultado de la congelación, criocongelación y/o criopreservación, en comparación con células congeladas a una densidad celular diferente y/o a una relación superficie/volumen diferente en las mismas condiciones o en condiciones similares. En determinadas divulgaciones, al menos o aproximadamente un 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 99% menos de células son células senescentes y/o quiescentes en comparación con células congeladas a una densidad celular diferente y/o a una relación superficie/volumen diferente en las mismas o similares condiciones. En ciertas divulgaciones, las células se congelan a la densidad celular divulgada y/o a la relación superficie/volumen y menos del 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 1%, 0,1% o 0,01% de las células se vuelven senescentes y/o quiescentes como resultado de la congelación, criocongelación y/o criopreservación.

[0588] En ciertas divulgaciones, las células son congeladas, por ejemplo, criocongeladas, a una densidad celular y/o área superficial a la relación de volumen descrita en el presente documento y tienen una expansión mejorada, más rápida y/o más rápida, por ejemplo, bajo condiciones estimulantes tales como por incubación con un reactivo estimulante descrito en el presente documento, después de que las células son descongeladas, en comparación con células congeladas a una densidad celular y/o área superficial a la relación de volumen diferente bajo las mismas o similares condiciones. En determinadas divulgaciones, las células se expanden a un ritmo que es más rápido y/o más rápido en, aproximadamente, o en al menos un 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 1 vez, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces o 10 veces en comparación con células congeladas a una densidad celular diferente y/o a una relación superficie/volumen diferente en las mismas o similares condiciones. Por ejemplo, en algunas divulgaciones, las células descongeladas alcanzan un umbral de expansión, por ejemplo, un número predeterminado de células, densidad, o factor tal como una expansión de 2 veces, en, en aproximadamente, o en al menos 5% 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, o 99%, menos tiempo que las células descongeladas que fueron congeladas a una densidad celular diferente y/o a una relación superficie/volumen diferente bajo las mismas o similares condiciones.

[0589] En algunas divulgaciones, las células son congeladas, por ejemplo, criocongeladas, a la densidad celular y han mejorado, aumentado, y/o más actividad citolítica, por ejemplo, tal como se mide por cualquier ensayo para medir la actividad citolítica descrita en el presente documento, después de que las células son descongeladas, en comparación con las células congeladas a una densidad celular diferente, por ejemplo, una densidad mayor o menor, bajo las mismas o similares condiciones. En determinadas divulgaciones, la actividad citolítica se incrementa en, aproximadamente o al menos en un 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 1 vez, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces o 10 veces en comparación con células congeladas a una densidad diferente en condiciones iguales o similares.

VI. COMPOSICIONES Y FORMULACIONES

[0590] También se divulgan composiciones que incluyen las células, incluidas composiciones y formulaciones farmacéuticas, como composiciones en forma de dosis unitaria que incluyen el número de células para su administración en una dosis o fracción determinada. Las composiciones y formulaciones farmacéuticas generalmente incluyen uno o más portadores o excipientes opcionales farmacéuticamente aceptables. En algunas divulgaciones, la composición incluye al menos un agente terapéutico adicional.

[0591] El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que tiene una forma tal que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en ella sea eficaz, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administraría la formulación.

[0592] Un "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no es tóxico para un sujeto. Un portador farmacéuticamente aceptable incluye, entre otros, un tampón, un excipiente, un estabilizador o un conservante.

[0593] En algunas divulgaciones, la elección del portador se determina en parte por la célula particular y/o por el método de administración. En consecuencia, existe una gran variedad de formulaciones adecuadas. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede contener conservantes. Los conservantes adecuados pueden incluir, por ejemplo, metilparabeno, propilparabeno, benzoato sódico y cloruro de benzalconio. En algunas divulgaciones, se utiliza una mezcla de dos o más conservantes. El conservante o sus mezclas suelen estar presentes en una cantidad comprendida entre el 0,0001% y el 2% en peso de la composición total. Los soportes se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980). Los portadores farmacéuticamente aceptables no suelen ser tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen, entre otros: tampones, como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, como ácido ascórbico y metionina; conservantes (como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de unos 10 residuos); proteínas, como la albúmina sérica, la gelatina o las inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, como la polivinilpirrolidona; aminoácidos, como la glicina, la glutamina, la asparagina, la histidina, la arginina o la lisina monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono, como glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, como EDTA; azúcares, como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal, como sodio; complejos metálicos (p. ej., complejos Zn-proteína); aminoácidos, como glicinap. ej. complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos como el polietilenglicol (PEG).

[0594] En algunas divulgaciones se incluyen agentes tamponadores en las composiciones. Entre los agentes tamponadores adecuados se encuentran, por ejemplo, el ácido cítrico, el citrato sódico, el ácido fosfórico, el fosfato potásico y otros ácidos y sales diversos. En algunas divulgaciones, se utiliza una mezcla de dos o más agentes amortiguadores. El agente tampón o sus mezclas suelen estar presentes en una cantidad de entre el 0,001% y el 4% en peso de la composición total. Se conocen métodos para preparar composiciones farmacéuticas administrables. Los métodos ejemplares se describen con más detalle en, por ejemplo, Remington: La ciencia y la práctica de la farmacia, Lippincott Williams & Wilkins; 21.^a edición. (1 de mayo de 2005).

[0595] Las formulaciones pueden incluir soluciones acuosas. La formulación o composición también puede contener más de un principio activo útil para la indicación, enfermedad o afección concreta que se esté tratando con las células, preferiblemente aquellos con actividades complementarias a las células, cuando las actividades respectivas no se afecten negativamente entre sí. Dichos ingredientes activos están convenientemente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el fin previsto. Así, en algunas divulgaciones, la composición farmacéutica incluye además otros agentes o fármacos farmacéuticamente activos, como agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, asparaginas, busulfán, carboplatino, cisplatino, daunorrubicina, doxorrubicina, fluorouracilo, gemcitabina, hidroxiurea, metotrexato, paclitaxel, rituximab, vinblastina y/o vincristina.

[0596] En algunas divulgaciones, la composición incluye las células en una cantidad efectiva para reducir la carga de la enfermedad o condición, y/o en una cantidad que no resulte en CRS o CRS grave en el sujeto y/o para efectuar cualquiera de los otros resultados de los métodos como se describe aquí.

[0597] La composición farmacéutica en algunas divulgaciones contiene las células en cantidades eficaces para tratar o prevenir la enfermedad o afección, como una cantidad terapéuticamente eficaz o profilácticamente eficaz. En algunas divulgaciones, la eficacia terapéutica o profiláctica se controla mediante evaluaciones periódicas de los sujetos tratados. La dosis deseada puede administrarse mediante un único bolo de células, mediante múltiples bolo de células o mediante infusión continua de células.

[0598] Las células y composiciones pueden administrarse utilizando técnicas, formulaciones y/o dispositivos de administración estándar. La administración de las células puede ser autóloga o heteróloga. Por ejemplo, las células o progenitores inmunorresponsables pueden obtenerse de un sujeto y administrarse al mismo sujeto o a un sujeto diferente y compatible. Las células inmunorreactivas derivadas de sangre periférica o su progenie (por ejemplo, derivadas in vivo, ex vivo o in vitro) pueden administrarse mediante inyección localizada, incluida la administración por catéter, inyección sistémica, inyección localizada, inyección intravenosa o administración parenteral. Cuando se administra una composición terapéutica (por ejemplo, una composición farmacéutica que contiene una célula inmunorresponsable modificada genéticamente), generalmente se formulará en una forma inyectable de dosis unitaria (solución, suspensión, emulsión).

[0599] Las formulaciones incluyen aquellas para administración oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, pulmonar, transdérmica, intramuscular, intranasal, bucal, sublingual o en supositorios. En algunas divulgaciones, las poblaciones celulares se administran por vía parenteral. El término "parenteral", tal como se utiliza aquí, incluye la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, rectal, vaginal e intraperitoneal. En algunas divulgaciones, las células se administran al sujeto mediante administración sistémica periférica por inyección intravenosa, intraperitoneal o subcutánea.

[0600] En algunas divulgaciones, las composiciones se divulgan como preparaciones líquidas estériles, por ejemplo,

- soluciones acuosas isotónicas, suspensiones, emulsiones, dispersiones o composiciones viscosas, que en algunas divulgaciones pueden tamponarse a un pH seleccionado. Las preparaciones líquidas suelen ser más fáciles de preparar que los geles, otras composiciones viscosas y las composiciones sólidas. Además, las composiciones líquidas son algo más cómodas de administrar, especialmente por inyección. Por otra parte, las composiciones viscosas pueden formularse dentro del intervalo de viscosidad adecuado para proporcionar periodos de contacto más prolongados con tejidos específicos. Las composiciones líquidas o viscosas pueden comprender portadores, que pueden ser un disolvente o medio dispersante que contenga, por ejemplo, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido) y mezclas adecuadas de los mismos.
- [0601]** Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando las células en un disolvente, por ejemplo en mezcla con un portador, diluyente o excipiente adecuado, como agua estéril, solución salina fisiológica, glucosa, dextrosa o similares. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares como agentes humectantes, dispersantes o emulsionantes (por ejemplo, metilcelulosa), agentes amortiguadores del pH, aditivos gelificantes o potenciadores de la viscosidad, conservantes, agentes aromatizantes y/o colorantes, dependiendo de la vía de administración y de la preparación deseada. En algunas divulgaciones pueden consultarse textos normativos para preparar los preparados adecuados.
- [0602]** Pueden añadirse diversos aditivos que mejoran la estabilidad y esterilidad de las composiciones, incluidos conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y tampones. La prevención de la acción de los microorganismos puede garantizarse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol y ácido sórbico. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede conseguirse mediante el uso de agentes retardadores de la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.
- [0603]** Las formulaciones que se utilizarán para la administración in vivo son generalmente estériles. La esterilidad puede lograrse fácilmente, por ej., por filtración a través de membranas de filtración estériles.
- [0604]** En algunas divulgaciones, la composición de células T terapéuticas comprende entre aproximadamente 10 millones de células por mL y aproximadamente 70 millones de células por mL o entre aproximadamente 10 millones de células viables por mL y aproximadamente 70 millones de células viables por mL, cada uno inclusive. En algunas divulgaciones, la composición de células T terapéuticas comprende entre aproximadamente 15 millones de células o células viables por mL y aproximadamente 60 millones de células o células viables por mL, cada una inclusive. En algunas divulgaciones, la composición de células T comprende más de 10 millones de células o células viables por mL. En algunas divulgaciones, la composición de células T terapéuticas comprende más de 15 millones de células o más de 15 millones de células por mL.
- [0605]** En algunas divulgaciones, el artículo contiene además información que indica que el contenedor, por ejemplo, un vial o una bolsa, como una bolsa IV, o una jeringa, contiene el número objetivo de unidades.
- [0606]** En algunas divulgaciones, el artículo de fabricación, el recipiente es un primer recipiente y el artículo comprende además recipientes adicionales, en donde cada uno de los recipientes adicionales comprende una dosis unitaria que comprende el número objetivo de unidades de la composición de células T. En algunas divulgaciones, los recipientes adicionales comprenden entre aproximadamente 10 millones de células o células viables por mL y aproximadamente 70 millones de células o células viables por mL, entre aproximadamente 15 millones de células o células viables y aproximadamente 60 millones de células o células viables por mL, más de 10 millones de células o células viables por mL, más de 15 millones de células o células viables por mL, cada uno inclusive, o una combinación de los mismos. En algunas divulgaciones, la composición comprende además un crioprotector y/o el artículo incluye además instrucciones para descongelar la composición antes de su administración al sujeto.
- [0607]** En algunas divulgaciones, las células se suspenden en una solución de congelación, *por ej.*, tras una etapa de lavado para eliminar el plasma y las plaquetas. Puede utilizarse cualquiera de las diversas soluciones y parámetros de congelación conocidos en algunas divulgaciones. Un ejemplo consiste en utilizar PBS que contenga un 20% de DMSO y un 8% de albúmina sérica humana (HSA), u otros medios de congelación celular adecuados. A continuación, se diluye 1:1 con los medios de forma que la concentración final de DMSO y HSA sea del 10% y 4%, respectivamente.
- [0608]** Puede utilizarse cualquiera de una variedad de soluciones y parámetros de congelación conocidos en algunas divulgaciones. En algunas divulgaciones, una muestra celular puede contener un medio o solución de criopreservación o vitrificación que contenga el crioprotector. Los crioprotectores adecuados incluyen, entre otros, dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, un glicol, un propilenglicol, un etilenglicol, propanodiol, polietilenglicol (PEG), 1,2-propanodiol (PROH) o una mezcla de los mismos. En algunas divulgaciones, la solución de criopreservación puede contener uno o más criopreservantes no permeables a las células, incluyendo pero no limitado a, polivinilpirrolidona, un hidroxietilalmidón, un polisacárido, un monosacárido, un alginato, trehalosa, rafinosa, dextrano, albúmina de suero humano, Ficoll, lipoproteínas, polivinilpirrolidona, hidroxietilalmidón, plasma autólogo o una mezcla de los mismos. En algunas divulgaciones, las células se suspenden en una solución de congelación con una concentración final de crioprotector de entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 20%, entre aproximadamente el 3% y aproximadamente el 9%, o entre aproximadamente el 6% y aproximadamente el 9% en volumen, cada uno inclusive. En ciertas divulgaciones, la concentración final de crioprotector en la solución de congelación es de aproximadamente 3%, aproximadamente 4%, aproximadamente 5%,

aproximadamente 5,5%, aproximadamente 6%, aproximadamente 6,5%, aproximadamente 7%, aproximadamente 7,5%, aproximadamente 8%, aproximadamente 8,5%, aproximadamente 9%, aproximadamente 9,5% o aproximadamente 10% en volumen.

5 **[0609]** En algunas divulgaciones, el crioprotector es DMSO. En divulgaciones particulares, las células se suspenden en una solución de congelación con una concentración final de DMSO de entre aproximadamente 1% y aproximadamente 20%, entre aproximadamente 3% y aproximadamente 9%, o entre aproximadamente 6% y aproximadamente 9% en volumen, cada uno inclusive. En ciertas divulgaciones, la concentración final de DMSO en la solución de congelación es de aproximadamente 3%, aproximadamente 4%, aproximadamente 5%, aproximadamente 5,5%, aproximadamente 6%,
10 aproximadamente 6,5%, aproximadamente 7%, aproximadamente 7,5%, aproximadamente 8%, aproximadamente 8,5%, aproximadamente 9%, aproximadamente 9,5% o aproximadamente 10% en volumen.

[0610] En ciertas divulgaciones, las células se suspenden en una solución de congelación a una densidad de entre aproximadamente 1×10^6 células/ mL y aproximadamente 1×10^8 células/ mL, entre aproximadamente 1×10^6 células/ mL y aproximadamente 2×10^7 células/ mL, entre aproximadamente 1×10^7 células/ mL y aproximadamente 5×10^7 células/ mL, o entre aproximadamente 1×10^7 células/ mL a 5×10^7 células/ mL, cada uno inclusive. En ciertas divulgaciones, las células se suspenden en la solución de congelación a una densidad de aproximadamente 1×10^6 células/ mL, aproximadamente 2×10^6 células/ mL, aproximadamente 5×10^6 células/ mL, aproximadamente 1×10^7 células/ mL, aproximadamente 1.5×10^7 células/ mL, aproximadamente 2×10^7 células/ mL, aproximadamente 2.5×10^7 células/ mL, aproximadamente 2.5×10^7 células/ mL, aproximadamente 2.5×10^7 células/ mL, aproximadamente 3×10^7 células/ mL, aproximadamente 3.5×10^7 células/ mL, aproximadamente 4×10^7 células/ mL, aproximadamente 4.5×10^7 células/ mL, o aproximadamente 5×10^7 células/ mL. En ciertas divulgaciones, las células se suspenden en la solución de congelación a una densidad de entre aproximadamente 1.5×10^7 células/ mL y aproximadamente 6×10^7 células/ mL, inclusive. En ciertas divulgaciones, las células se suspenden en una solución de congelación a una densidad de al menos aproximadamente 1×10^7 células/ mL. En determinadas divulgaciones, las células se suspenden en una solución de congelación a una densidad de al menos aproximadamente 1.5×10^7 células/ mL. En algunas divulgaciones, las células son células viables.

[0611] En algunas divulgaciones, la transferencia al medio de criopreservación se asocia con uno o más pasos de procesamiento que pueden implicar el lavado de la muestra, por ejemplo, la composición de células de ingeniería, como para eliminar el medio y/o reemplazar las células en un tampón o medio de criopreservación apropiado para su posterior congelación. En ciertas divulgaciones, la transferencia al medio de criopreservación está totalmente automatizada a escala clínica en un sistema cerrado y estéril. En ciertas divulgaciones, la transferencia al medio de criopreservación se realiza utilizando el sistema CliniMACS (Miltenyi Biotec).

35 **[0612]** En algunas divulgaciones, las células se congelan, por ejemplo, se criopreservan, ya sea antes, durante o después de dichos métodos de procesamiento y/o ingeniería de las células. En algunas divulgaciones, el paso de congelación y posterior descongelación elimina los granulocitos y, en cierta medida, los monocitos de la población celular. A continuación, las células se congelan generalmente a -80°C . a un ritmo de 1° por minuto y se almacenan en la fase de vapor de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido.

40 **[0613]** En algunas divulgaciones, la composición se encierra en una bolsa adecuada para la criopreservación (por ejemplo, CryoMacs® Freezing Bags, Miltenyi Biotec). En algunas divulgaciones, la composición se encierra en un vial adecuado para la criopreservación (por ejemplo, CellSeal® Vials, Cook Regentec).

45 VII. ARTÍCULOS DE FABRICACIÓN

[0614] También se divulgan artículos de fabricación, tales como kits y dispositivos, para la administración de las células a sujetos de acuerdo con los métodos divulgados para terapia celular adoptiva, y para el almacenamiento y administración de las células y composiciones.

50 **[0615]** Los artículos de fabricación incluyen uno o más recipientes, típicamente una pluralidad de recipientes, material de envasado, y una marcación o prospecto en o asociado con el recipiente o recipientes y/o envase, que generalmente incluye instrucciones para la administración de las células a un sujeto.

55 **[0616]** Los recipientes contienen generalmente las células a administrar, por ejemplo, una o más dosis unitarias de las mismas. El artículo de fabricación suele incluir una pluralidad de recipientes, cada uno de los cuales contiene una única dosis unitaria de las células. La dosis unitaria puede ser una cantidad o número de las células que se administrarán al sujeto en la primera dosis o el doble del número (o más) de las células que se administrarán en la primera dosis o en una o más dosis consecutivas. Puede ser la dosis más baja o la dosis más baja posible de las células que se administrarían al sujeto en relación con el método de administración. En algunas divulgaciones, la dosis unitaria es el número mínimo de células o el número de células o el número mínimo de unidades de referencia o las unidades de referencia objetivo o las unidades de referencia dentro de un intervalo objetivo que se administrarían en una dosis única a cualquier sujeto que tenga una enfermedad o afección particular o a cualquier sujeto, según los métodos aquí descritos. En algunas divulgaciones, el número de células en la dosis unitaria es el número de células o el número de células que expresan receptores recombinantes o CAR, o el número de dichas células de un determinado fenotipo, por ejemplo CD8+, marcador de apoptosis negativo (por ejemplo Anexina V- o Caspasa 3-) y CD8+, que se desea administrar a un sujeto concreto en

- una dosis, como un sujeto del que se han derivado las células. En algunas divulgaciones, el número objetivo de unidades de referencia o las unidades de referencia con un intervalo objetivo en la dosis unitaria son las unidades de referencia de la composición en función del número de células o del número de células que expresan receptores recombinantes o que expresan CAR, o del número de dichas células de un determinado fenotipo, por ej.p. ej. CD8+, marcador de apoptosis negativo (p. ej. Anexina V- o Caspasa 3-) y CD8+ y la actividad dependiente del receptor recombinante (p. ej. actividad antígeno-específica) de la composición, y que se desea administrar a un sujeto particular en una dosis, tal como un sujeto del que se han derivado las células. En algunas divulgaciones, las células se han derivado del sujeto que se va a tratar con los métodos aquí divulgados o que los necesita.
- [0617]** En algunas divulgaciones, el artículo de fabricación contiene una dosis unitaria de células que contienen un número objetivo de unidad de referencia (RU) dentro de un intervalo dado, tal como según la fórmula como se describe en otra parte del presente documento. Las dosis unitarias ejemplares del número objetivo de unidades de referencia (RU) o del número objetivo de células totales incluyen cualquiera de las descritas a lo largo de esta divulgación.
- [0618]** En algunas divulgaciones, cada uno de los recipientes comprende individualmente una dosis unitaria de las células, por ejemplo, incluyendo el mismo o sustancialmente el mismo número de células o número de células que expresan receptores recombinantes o células que expresan CAR, o número de tales células de un cierto fenotipo, por ejemplo CD8+, marcador de apoptosis negativo (por ejemplo Anexina V- o Caspasa 3-). En algunas divulgaciones, cada uno de los contenedores comprende individualmente una dosis unitaria de las células, por ejemplo, incluyendo el mismo o sustancialmente el mismo número de unidades de referencia objetivo o un número de unidades de referencia dentro de un intervalo objetivo.
- [0619]** Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas y bolsas flexibles, como bolsas de infusión. En determinadas divulgaciones, los contenedores son bolsas, por ejemplo, bolsas flexibles, como las adecuadas para la infusión de células a sujetos, por ejemplo, bolsas de plástico flexible o PVC, y/o bolsas de solución intravenosa. Las bolsas en algunas divulgaciones son sellables y/o capaces de ser esterilizadas, con el fin de proporcionar una solución estéril y la entrega de las células y composiciones. En algunas divulgaciones, los recipientes, por ejemplo, bolsas, tienen una capacidad de al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 o 1000 mL, como entre al menos 10 y al menos 100 o entre al menos 10 y al menos 500 mL, cada uno inclusive. En algunas divulgaciones, los recipientes, por ejemplo, bolsas, son y/o están hechos de material que es estable y/o proporciona un almacenamiento y/o mantenimiento estable de las células a una o más de varias temperaturas, tales como en temperaturas frías, por ejemplo, por debajo de o aproximadamente o aproximadamente -20 °C, -80 °C, - 120 °C, 135 °C y/o temperaturas adecuadas para la criopreservación, y/u otras temperaturas, tales como temperaturas adecuadas para descongelar las células y la temperatura corporal, tales como a o aproximadamente 37 °C, por ejemplo, para permitir la descongelación, por ejemplo, en el lugar del sujeto o en el lugar del tratamiento, por ejemplo, junto a la cama, inmediatamente antes del tratamiento.
- [0620]** Los recipientes pueden estar hechos de diversos materiales, como vidrio o plástico. En algunas divulgaciones, el contenedor tiene uno o más puertos, por ejemplo, puertos de acceso estériles, por ejemplo, para la conexión de tubos o canulación a uno o más tubos, por ejemplo, para infusión intravenosa o de otro tipo y/o para la conexión con fines de transferencia a y desde otros contenedores, como bolsas de cultivo celular y/o almacenamiento u otros contenedores. Los recipientes ejemplares incluyen bolsas de infusión, bolsas de solución intravenosa, viales, incluidos aquellos con tapones perforables por una aguja para inyección.
- [0621]** El artículo de fabricación puede incluir además un prospecto o marcación con uno o más datos identificativos y/o instrucciones de uso. En algunas divulgaciones, la información o las instrucciones indican que los contenidos pueden o deben utilizarse para tratar una afección o enfermedad concreta, y/o proporcionan instrucciones al respecto. La marcación o el prospecto pueden indicar que el contenido del artículo de fabricación debe utilizarse para tratar la enfermedad o afección. En algunas divulgaciones, la marcación o prospecto proporciona instrucciones para tratar a un sujeto, por ejemplo, el sujeto del que se han derivado las células, mediante un método que implica la administración de una primera y una o más dosis consecutivas de las células, por ejemplo, según cualquiera de las divulgaciones de los métodos divulgados. En algunas divulgaciones, las instrucciones especifican la administración, en una primera dosis, de una dosis unitaria, por ejemplo, el contenido de un único envase individual del artículo de fabricación, seguida de una o más dosis consecutivas en un punto temporal especificado o dentro de una ventana temporal especificada y/o tras la detección de la presencia o ausencia o cantidad o grado de uno o más factores o resultados en el sujeto.
- [0622]** En algunas divulgaciones, las instrucciones especifican la administración de una o más de las dosis unitarias al sujeto.
- [0623]** En algunas divulgaciones, la marcación o prospecto o envase comprende un identificador para indicar la identidad específica del sujeto del que se derivan las células y/o que se va a administrar. En el caso de la transferencia autóloga, la identidad del sujeto del que proceden las células es la misma que la del sujeto al que se le van a administrar. Así, la información identificativa puede especificar que las células se van a administrar a un paciente concreto, como aquel del que proceden originalmente las células. Dicha información puede estar presente en el material de envasado y/o en la marcación en forma de código de barras u otro identificador codificado, o puede indicar el nombre y/u otras características identificativas del sujeto.

[0624] El artículo de fabricación en algunas divulgaciones incluye uno o más, típicamente una pluralidad, de recipientes que contienen composiciones que comprenden las células, por ejemplo, formas de dosis unitarias individuales de las mismas, e incluyen además uno o más recipientes adicionales con una composición contenida en los mismos que incluye un agente adicional, tal como un agente citotóxico o terapéutico de otro tipo, por ejemplo, que se va a administrar en combinación, por ejemplo, simultánea o secuencialmente en cualquier orden, con las células. Alternativa o adicionalmente, el artículo de fabricación puede incluir además otro o el mismo recipiente que comprenda un tampón farmacéuticamente aceptable. Puede incluir además otros materiales como otros tampones, diluyentes, filtros, tubos, agujas y/o jeringas.

[0625] El término "prospecto" se utiliza para referirse a las instrucciones incluidas habitualmente en los envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, terapia combinada, contraindicaciones y/o advertencias relativas al uso de dichos productos terapéuticos.

VIII. DEFINICIONES

[0626] A menos que se defina de otro modo, todos los términos de la técnica, notaciones y otros términos o terminología técnica y científica utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por una persona con conocimientos ordinarios en la técnica a la que pertenece la materia reivindicada. En algunos casos, los términos con significados comúnmente entendidos se definen aquí para mayor claridad y/o para facilitar la referencia, y la inclusión de tales definiciones aquí no debe interpretarse necesariamente como una diferencia sustancial sobre lo que generalmente se entiende en la técnica.

[0627] Tal como se utilizan aquí, las formas singulares "un/una", y "el/la" incluyen una referencia plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, "un" o "una" significa "al menos uno" o "uno o más". Se entiende que los aspectos y variaciones aquí descritos incluyen aspectos y variaciones "consistentes" y/o "consistentes esencialmente en".

[0628] A lo largo de esta divulgación, varios aspectos de la materia reivindicada se presentan en un formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalo es meramente por conveniencia y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible sobre el alcance de la materia reivindicada. En consecuencia, debe considerarse que la descripción de un intervalo ha revelado específicamente todos los posibles subintervalos, 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 declarado o intermedio en ese intervalo declarado está comprendido dentro de la materia reivindicada. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños, y también están comprendidos dentro del objeto reivindicado, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo declarado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen uno o ambos límites incluidos también se incluyen en el objeto descrito o reivindicado. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

[0629] El término "aproximadamente", tal como se utiliza aquí, se refiere al intervalo de error habitual para el valor respectivo fácilmente conocido por el experto en este campo técnico. La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro incluye (y describe) realizaciones dirigidas a ese valor o parámetro *per se*. Por ejemplo, la descripción referida a "sobre X" incluye la descripción de "X".

[0630] Como se usa aquí, una composición se refiere a cualquier mezcla de dos o más productos, sustancias o compuestos, incluyendo células. Puede ser una solución, una suspensión, un líquido, un polvo, una pasta, acuosa, no acuosa o cualquier combinación de los mismos.

[0631] Como se usa aquí, una declaración de que una célula o población de células es "positiva" para un marcador particular se refiere a la presencia detectable en o sobre la célula de un marcador particular, típicamente un marcador de superficie. Cuando se hace referencia a un marcador de superficie, el término se refiere a la presencia de expresión de superficie detectada por citometría de flujo, por ejemplo, mediante tinción con un anticuerpo que se une específicamente al marcador y la detección de dicho anticuerpo, en el que la tinción es detectable por citometría de flujo a un nivel sustancialmente superior a la tinción detectada llevando a cabo el mismo procedimiento con un control de isotipo coincidente en condiciones por lo demás idénticas y/o a un nivel sustancialmente similar al de la 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.

[0632] Como se usa aquí, una declaración de que una célula o población de células es "negativa" para un marcador particular se refiere a la ausencia de presencia sustancial detectable en o sobre la célula de un marcador particular, típicamente un marcador de superficie. Cuando se hace referencia a un marcador de superficie, el término se refiere a la ausencia de expresión de superficie detectada por citometría de flujo, por ejemplo, mediante tinción con un anticuerpo que se une específicamente al marcador y detección de dicho anticuerpo, en la que la tinción no se detecta por citometría de flujo a un nivel sustancialmente superior a la tinción detectada llevando a cabo el mismo procedimiento con un control de isotipo coincidente en condiciones por lo demás idénticas, y/o a un nivel sustancialmente inferior al de la célula que se sabe que es positiva para el marcador, y/o a un nivel sustancialmente similar en comparación con el de una célula que se sabe que es negativa para el marcador.

5 [0633] El término "vector", como se usa aquí, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de propagar otro ácido nucleico al cual está ligado. El término incluye el vector como estructura de ácido nucleico autorreplicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que se ha introducido. Ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los ácidos nucleicos a los que están operativamente unidos. Tales vectores se denominan aquí "vectores de expresión".

X. EJEMPLOS

10 [0634] Los siguientes ejemplos se incluyen únicamente con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1: Determinación de los parámetros de las composiciones de células T CAR+ que son predictivos de neurotoxicidad grave.

15 [0635] Se evaluaron varios parámetros tras el tratamiento de sujetos con leucemia linfoblástica aguda (ALL) recidivante o refractaria con composiciones terapéuticas que contenían células T autólogas diseñadas para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) anti-CD19. Los parámetros evaluados incluyeron parámetros de las composiciones y dosis de células terapéuticas (incluidas las características funcionales y el número y frecuencia de células de diversos fenotipos), características de los pacientes y parámetros clínicos y de tratamiento, incluidos los indicativos de resultados relacionados con la respuesta y la toxicidad.

25 [0636] Los parámetros se analizaron para sujetos individuales, post facto, y se compararon entre sujetos utilizando una serie de análisis estadísticos, incluyendo análisis descriptivos, gráficos, no paramétricos y basados en modelos. Se evaluaron las relaciones entre los distintos parámetros. En particular, el estudio evaluó el grado en que diversos parámetros de pacientes individuales y de las composiciones o dosis celulares, se correlacionaban (directa o inversamente) con la probabilidad de presentar una respuesta terapéutica y/o con el riesgo de un resultado adverso como la neurotoxicidad, por ejemplo, neurotoxicidad grave o de grado 5 y edema cerebral.

30 A. Terapia de células T CAR+

[0637] A los sujetos (N=38) evaluados se les había administrado una composición de células T que contenía células T autólogas que expresaban un receptor de antígeno quimérico (CAR) anti-CD19 para el tratamiento de la ALL en adultos. Al inicio del tratamiento, de los 38 sujetos, treinta y dos (32) habían mostrado evidencia morfológica de enfermedad en la médula ósea (al menos 5% de blastos) y seis (6) habían mostrado enfermedad detectable molecularmente por PCR. Los sujetos tenían 18 años o más, con enfermedad morfológica CD19 positiva recidivante o refractaria (definida por más de un 5% de blastos en la médula ósea), incluida la enfermedad extramedular y con cromosoma Filadelfia positivo (Ph+), con primer tratamiento de rescate o superior (incluido el tratamiento con células madre hematopoyéticas post alogénico), y tenían puntuaciones de 0-2 del Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG). Los sujetos tenían una función orgánica adecuada, según lo indicado por valores de creatinina sérica $\leq 1,5 \times$ límite superior de la normalidad [LSN] o aclaramiento de creatinina de > 30 ml/min/1,73 m², alanina aminotransferasa $< 5 \times$ LSN, bilirrubina $< 2,0$ mg/dL, disnea $\leq$ grado 1 y oxígeno saturado de $\geq 92\%$ con aire ambiente, y fracción de eyección ventricular izquierda $\geq 40\%$. Se incluyeron sujetos con tratamiento previo con blinatumomab. Los criterios de exclusión incluían enfermedad extramedular aislada o enfermedad de Burkett, afectación activa del CNS con la enfermedad (CNS3) o patología del CNS, enfermedad de injerto contra huésped (GvHD) aguda (grado II-IV) activa o crónica extensa, infección activa y terapia génica previa. También se excluyeron los sujetos tratados con alemtuzumab en los últimos 6 meses, clofarabina o cladribina en los últimos 3 meses, medicación para la EICH en las últimas 4 semanas o quimioterapia de rescate y corticosteroides terapéuticos en la última semana.

50 [0638] Los datos demográficos y las características basales de los sujetos incluidos en el estudio se muestran en la Tabla E1A.

Tabla E1-A: Datos demográficos y características iniciales

	Todos los sujetos (N = 38)	Sujetos morfológicos (n = 32)	Sujetos MRD+ (n = 6)
Masculino, n(%)	28 (74)	25 (78)	3 (50)
Edad, media (intervalo), años	39 (19-69)	28 (74)	34 (24-47)
Edad >30 años, n(%)	22 (58)	19 (59)	3 (50)
Blanco, n (%)	34 (89)	28 (88)	6 (100)
Tiempo desde la diagnosis primaria (intervalo), años	1.8 (0.5-21.5)	1.7 (0.5-10.6)	2.2 (0.6-21.5)
Regímenes previos, medios (intervalo)	2 (1-7)	2 (1-7)	2 (1-3)
Ph+, n (%)	4 (11)	4 (13)	0 (0)
Blinatumomab previo, n (%)	4 (11)	16 (50)	3 (50)
HSCT previo, n (%)	14 (37)	11 (34)	3 (50)
Enfermedad CNS previa, n (%)	8 (21)	7 (22)	1 (17)
Radiación CNS previa, n (%)	12 (32)	11 (34)	1 (17)
Quimioterapia IT previa, n (%)	30 (79)	26 (81)	4 (67)
Blastos BM Pre-LD, media (intervalo), %	48 (0-98)	66 (6-98)	2 (0-4)
Tratamiento de puente agresivo, n (%) ^a	19 (50)	17 (53)	2 (33)

IT, intratecal; LD, linfodepleción.

^aHiper CVAD partes A o B, regímenes que contienen fludarabina y/o citarabina.

[0639] Las composiciones de células T terapéuticas administradas se habían generado mediante un proceso que incluía la selección basada en inmunofluorescencia de células T (incluidas células CD4+ y CD8+) a partir de muestras de leucaféresis de los sujetos individuales, seguida de activación y transducción con un vector viral que codifica el CAR anti-CD19, expansión y criopreservación. El CAR contenía un scFv anti-CD19 derivado de un anticuerpo murino, una región de CD28 que incluía una región extracelular, un dominio transmembrana y una región coestimuladora, y un dominio de señalización intracelular CD3-zeta. Las composiciones celulares criopreservadas se descongelaron a pie de cama antes de la administración intravenosa. Se administraron volúmenes enteros de composiciones celulares que se habían llenado y criopreservado.

[0640] Las células se habían administrado a una primera dosis objetivo de aproximadamente 1×10^6 células CD3+CAR+/kg (peso corporal del sujeto). La dosis objetivo y el intervalo de dosis para la administración se habían evaluado en parte basándose en la comparación de los resultados de toxicidad de un grupo de sujetos con enfermedad morfológica a los que se habían administrado composiciones similares, en un intervalo de diferentes números de células CD3+CAR+ por dosis administrada. En particular, se evaluó la relación entre la dosis de CD3+CAR+/kg y el hecho de que un sujeto desarrollara o no neurotoxicidad de grado 3, y la dosis objetivo y el intervalo de dosis fue inferior al número más bajo de células CD3+CAR+/kg administrado a cualquiera de dichos sujetos que hubiera demostrado neurotoxicidad de grado 3 o superior, menos un margen de seguridad de al menos 1.5×10^6 células CD3+CAR+/kg. Véase la figura 22. La dosis no tuvo en cuenta el número ni la frecuencia de células CD4+ frente a CD8+, ni de otros subconjuntos de células T. Se evaluó la actividad citotóxica frente a células CAR antígeno+ como medida de potencia. Algunos sujetos recibieron una segunda dosis, aproximadamente entre 14 y 28 días después de la dosis inicial. Antes de la administración de las células autólogas que expresan CAR, se había administrado a los sujetos una quimioterapia linfodepletor de precondicionamiento que contenía una dosis única de ciclofosfamida (aproximadamente 1-3 g/m²) sola o ciclofosfamida (30-60 mg/kg) y fludarabina (25 mg/m²- 30 mg/m², administrada diariamente durante tres días).

5 [0641] Los sujetos fueron monitorizados para la respuesta y otros resultados, incluyendo el examen de la médula ósea, sangre periférica y líquido cefalorraquídeo (LCR). También se evaluó y controló la neurotoxicidad de los sujetos (complicaciones neurológicas que incluyen síntomas de confusión, afasia, encefalopatía, ataques mioclónicos, convulsiones, letargo y/o alteración del estado mental), calificada en una escala de 1 a 5, según la escala de Criterios Comunes de Toxicidad (CTCAE) del Instituto Nacional del Cáncer, versión 4.03 (NCI-CTCAE v4.03). Escala de Criterios Comunes de Toxicidad (CTCAE), versión 4.03 (NCI-CTCAE v4.03). Véase la Terminología común para los efectos adversos (CTCAE), versión 4, EE.UU. Departamento de Salud y Servicios Humanos, Publicado: 28 de mayo de 2009 (v4.03: 14 de junio de 2010); y Guido Cavaletti & Paola Marmioli). También se determinó y controló el síndrome de liberación de citoquinas (CRS), graduado en función de su gravedad.

15 [0642] La respuesta (porcentaje de sujetos que mostraron una respuesta completa (CR) o una respuesta completa con recuperación incompleta de la médula (RCi) (tasa de RC/RCi) (en una mediana de 4 meses de seguimiento)), y los resultados de toxicidad se resumen en las tablas E1-B y E1-C para los sujetos que habían mostrado enfermedad morfológica al inicio del tratamiento. (NE=non-evaluable). Como se muestra, el 56% de los sujetos desarrollaron neurotoxicidad de grado 3-5. Cinco (5) sujetos desarrollaron neurotoxicidad de grado 5 y, en particular, edema cerebral de grado 5.

Tabla E1-B: Resumen de los sujetos tratados

Morfológicos	Cy	Flu/Cy
Tasa CR/RCi	50 % NE 8 %	100% NE: 37%
CRS grave (grado 3 o más alto)	17%	38%
Neurotoxicidad grado 3-5	46% Grado 5: 8%	88% Grado 5: 38%

Tabla E1-C: Resultados de 32 sujetos tratados con enfermedad morfológica (total de sujetos tratados = 38)

	CY	Flu/Cy	CY	Morfológicos totales	MRD total
Periodo de tiempo	Periodo de tiempo 1	Periodo de tiempo 2	Periodo de tiempo 3		
Sujetos, N	14	8	10	32	6
Tasa CR/CRi # No Evaluable	6/14 (43%)	5/5 (100%); 3 NE	4/8 (50%)		

CRS grave Grado 3/4	1/14 (7%)	3/8 (38%)	3/10 (30%)	7 (22%)	2 (33%)
NTX grave Grado 3-5	3/14(21%)	7/8(88%)	8/10(80%)	18 (56%)	2 (33%)
Mortalidad relacio- nada con el tratami- ento	Grado 5 eventos: 0	Grado 5 eventos: 3 (todos los eventos NTX)	Grado 5 eventos: 2 (ambos eventos NTX)	Grado 5 eventos: 5 (16%)	Grado 5 eventos: 0

Otros 6 sujetos tratados dieron positivo para enfermedad mínima residual (MRD+) en el momento del tratamiento

[0643] Se han notificado al menos 15 casos de neurotoxicidad de grado 5 y al menos 13 casos de edema cerebral asociados a la terapia con células CAR-T en varios ensayos clínicos diferentes, según se desprende de la información públicamente disponible, incluso en ensayos con células CAR-T que expresan diferentes CAR con diferentes dominios de unión a antígeno y diferentes dominios coestimuladores, producidas con diferentes protocolos de fabricación, y para el tratamiento de diferentes enfermedades o indicaciones.

B. Farmacocinética (PK) de las células T CAR+ en sangre

[0644] El análisis se llevó a cabo en muestras derivadas de sangre de sujetos en varios puntos temporales tras la administración de la primera y, en su caso, segunda dosis de las composiciones celulares. Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo para determinar la presencia y el número de células que expresaban CAR en la sangre.

[0645] Como se muestra en las FIGS. 1 y 2, se observaron expansiones máximas más rápidas de células T que expresaban CAR en la sangre de los sujetos que desarrollaron neurotoxicidad más grave y, en particular, en los que desarrollaron neurotoxicidad de grado 5 y edema cerebral. Por ejemplo, los resultados indicaron que estos sujetos habían exhibido un nivel detectable de células CAR+ por μ L de sangre entre 4 y 7 días después de la primera dosis de células, observándose más de 20 células CAR+ por μ L de sangre en la sangre de todos estos sujetos en los siete días siguientes a la administración de las células. En los sujetos con neurotoxicidad de grado 3 ó 4, el pico de expansión de las células T CAR+ se observó generalmente más tarde y con un menor número máximo de células T CAR+ por microlitro (FIG. 2).

C. Evaluación y comparación de parámetros clínicos, de pacientes, traslacionales y de CMC en diferentes sujetos

[0646] Se evaluaron varios parámetros para diferentes grupos de pacientes, según la gravedad de la enfermedad al inicio del tratamiento y los resultados del tratamiento o el desarrollo de toxicidad, incluidos diversos grados de neurotoxicidad. La presencia o ausencia de correlaciones y la significación se evaluaron mediante análisis descriptivos, gráficos, no paramétricos y basados en modelos, tal como se describe en este Ejemplo y en el Ejemplo 2. Se analizaron unos 500 parámetros clínicos y traslacionales mediante regresión logística univariante y multivariante. Se examinaron aproximadamente 140 parámetros de Química, Fabricación y Control (CMC) en análisis univariantes y multivariantes mediante pruebas no paramétricas y métodos basados en particiones (árbol de decisión).

[0647] Se evaluaron varios atributos CMC en muestras de las composiciones de células T que habían sido administradas a los sujetos (descongeladas de muestras de composiciones terapéuticas criopreservadas que habían sido administradas a los sujetos (CDP)). Se analizaron las muestras para detectar la presencia, ausencia, nivel, nivel normalizado, cantidad y/o cantidad normalizada de diversos parámetros. Entre los atributos clínicos y de los pacientes que se evaluaron a modo de ejemplo se encontraban la edad del paciente, los antecedentes de tratamiento previo y si el paciente había recibido una quimioterapia linfodepletor y/o de mantenimiento antes del tratamiento, el desarrollo y el grado de neurotoxicidad y otros resultados tóxicos. Los parámetros específicos de la composición celular y/o relacionados con la dosis incluían cantidades y frecuencias (o valores normalizados de las mismas) de diversas poblaciones celulares (en la dosis administrada y/o administrada por peso del sujeto), producción de citocinas, actividad citotóxica en respuesta a la estimulación del antígeno CAR, y otros parámetros indicativos de la función como de activación o estimulación y/o función efectora en respuesta a diversas condiciones. Se evaluó el grado de correlación de los diversos parámetros (individualmente y en algunos casos combinaciones de los mismos) en las composiciones terapéuticas con la neurotoxicidad y otros resultados observados en sujetos individuales tras la infusión de las células T CAR+.

[0648] Los resultados de análisis estadísticos ejemplares para ciertos parámetros para un subconjunto de sujetos que exhibieron enfermedad morfológica al inicio del tratamiento fueron consistentes con un hallazgo de que la edad del paciente, el historial de tratamiento previo y la quimioterapia linfodepletor y/o de retención se correlacionaron (directa o inversamente) con el desarrollo de neurotoxicidad de grado 5. Por ejemplo, en este grupo de sujetos, los pacientes más jóvenes, menores de 30 años, los que habían recibido un menor número (igual o inferior a dos) de terapias previas y los que habían recibido fludarabina en un plazo de 3 meses o una quimioterapia de mantenimiento agresiva tenían más probabilidades de haber desarrollado neurotoxicidad de grado 5 en este estudio. Las estimaciones de odds ratio calculadas para experimentar edema cerebral tras el tratamiento con la terapia celular para factores clínicos ejemplares se muestran en la Tabla E1-D. La odds ratio se calculó dividiendo las probabilidades de desarrollar una neurotoxicidad de grado 5 asociada a los antecedentes demográficos o de tratamiento por las probabilidades asociadas a la ausencia de antecedentes demográficos o de tratamiento. Un odds ratio superior a 1 indicaba una mayor probabilidad de desarrollar neurotoxicidad de grado 5.

Tabla E1-D: Factores clínicos ejemplares asociados al edema cerebral

Demografía/ Historial de Tratamiento	Relación de Probabilidades	95% de CI	Valor P
Flu/CY LD recibido	7.25	1.14, 53.96	0.045
Quimioterapia de puente de alta intensidad recibida	4.68	0.63, 32.64	0.133
Edad < 30 años	5.16	0.83, 55.93	0.112
≤ 2 líneas previas de terapia	7.24	0.72, 980.23	0.208

[0649] No se observó ninguna asociación de mayor riesgo para la irradiación previa del SNC, el tratamiento previo con quimioterapia intratecal (IT), la enfermedad previa del SNC, la terapia celular alogénica previa, el estado funcional ECOG más alto o el tratamiento previo con blinatumomab.

[0650] En este estudio, algunos de estos parámetros (p. ej, edad del paciente joven (≤ 30 años) y menos tratamientos previos) también se observó que se correlacionaban con ciertos atributos específicos de la composición terapéutica o relacionados con la dosis (incluido el número total de células CD8+CAR+AnnV negativas que un sujeto había recibido en una dosis de células y el nivel de acumulación específica de antígeno de la citocina proinflamatoria, IL-2, medida en cultivos de la composición celular terapéutica descongelada en presencia de células que expresan CD19, el antígeno CAR, indicativo de actividad celular inducida por CAR). También entre los atributos ejemplares evaluados se encontraban los números o frecuencias de (o números/kg de) células viables, y/o células de varios fenotipos, en dosis individuales administradas a sujetos individuales. Ejemplos de tales fenotipos incluyen la expresión de uno o más marcadores de

superficie, evaluados por citometría de flujo. Por ejemplo, los fenotipos incluían CD3+, CD8+, CD4+ y/o CAR+. Entre los fenotipos también se encontraban la viabilidad y los asociados o indicativos de células funcionales, sanas o biológicamente activas. En algunos aspectos, dichos fenotipos incluían la presencia o expresión negativa o baja de marcadores indicativos de apoptosis, de células apoptóticas o de diversas etapas, por ejemplo, tempranas o tardías, de una o más vías de muerte o entrada apoptótica (por ejemplo, anexina V, caspasa 3). En algunos aspectos, dichos marcadores incluían la capacidad de las células para producir citocinas u otros factores de una manera no específica de antígeno CAR, como en una tinción intracelular de citocinas (ICS) en respuesta a PMA/ionomicina y/o FOXP3. En algunos aspectos, los marcadores y fenotipos incluyen los asociados con la activación de células T, agotamiento, propiedades similares a las de las células madre, células T ingenuas, longevidad, subconjuntos de células T, fenotipo(s) de memoria y fenotipos de subconjuntos de memoria T como T_{CM} , T_{EM} , T_{SCM} .

[0651] Por ejemplo, los atributos terapéuticos relacionados con la composición celular incluyen el número total de células T CD8+CAR+ en la dosis administrada, el número total o la frecuencia (por ejemplo, entre células T CD8+CAR+) de células T CD8+CAR+ en la dosis administrada que se observaron negativas para un factor indicativo de apoptosis, tal como tinción de superficie con Anexina V (Anexina V-) o escisión de caspasa 3 (indicando células no apoptóticas). En algunos ejemplos, los atributos terapéuticos relacionados con la composición celular incluyeron número total de células T CD3+CAR+ en la dosis administrada, número total o frecuencia (por ejemplo, entre células T CD3+CAR+) de células T CD3+CAR+ en la dosis administrada que se observaron como negativas para un factor indicativo de apoptosis, como la tinción de superficie con Anexina V (Anexina V-) o la rotura de caspasa 3 (que indica células no apoptóticas).

[0652] También entre los parámetros ejemplares se encontraban propiedades particulares de las composiciones terapéuticas y/o la producción de las mismas, incluyendo la concentración de células viables (VCC), la expansión de pliegues de las células entre la inoculación y la cosecha del producto farmacológico; y el número de copias del vector (VCN) en la dosis administrada.

[0653] También entre los parámetros ejemplares estaban aquellos generalmente asociados con o indicativos de función o actividad u otras características o capacidades de las células en las composiciones. Entre estos se encontraban varios atributos asociados con los resultados de la estimulación celular, incluidos varios indicios de proliferación y activación o actividad, incluidos los inducidos de forma inducida o dependiente de TCR y/o CAR. Ejemplos de tales parámetros relacionados con la función o la actividad fueron las medidas o niveles (como la cantidad o concentración o nivel de los mismos por célula) de producción de uno o más factores (como diversas citocinas) por las células de la composición, en respuesta a la estimulación específica de antígeno CAR u otra estimulación.

[0654] En los ensayos de tinción intracelular de citoquinas (ICS), se utilizaron métodos basados en flujo para evaluar la capacidad de las células en la composición para producir varias citoquinas en respuesta a estímulos no específicos de antígeno. Las células se estimularon con PMA/ionomicina en presencia de un inhibidor de Golgi. La expresión de FoxP3 se evaluó mediante un ensayo qPCR dirigido a la región de desmetilación específica de Treg (TSDR) del gen FOXP3. No se observaron niveles de FOXP3 indicativos del fenotipo Treg.

[0655] En ensayos de co-cultivo se evaluaron varios parámetros indicativos de las actividades y funciones específicas del antígeno dirigido por CAR (como la secreción de citocinas y la citotoxicidad dependientes del antígeno CAR) de las composiciones. Las células de la composición terapéutica evaluada se incubaron en presencia de células diana que expresaban CD19. Para los ensayos de citocinas, se evaluaron las cantidades acumuladas (pg/mL) de la(s) citocina(s) (por ejemplo, IL-2, IFN-gamma, TNF-alfa, IL-6, sCD137, MIP1b, MIP1a, IL-10, IL-4, IL-13, IL-5 o GM-CSF) tras la incubación de células diana y una cantidad de las diversas composiciones que incluían el mismo número de células transducidas o CAR+, en el mismo volumen, durante un periodo de aproximadamente 22-24 horas. Dichos ensayos proporcionaron una medida de la secreción de citocinas específicas de antígeno por célula CAR+ en la dosis. En otros ensayos, se evaluó la actividad citolítica contra las células diana que expresaban CD19 tras la incubación con las células T.

[0656] En algunos casos, se evaluaron medidas de actividad o efecto funcional en respuesta a un estímulo no específico de antígeno CAR, como la producción de citocina u otro factor tras la estimulación con anti-CD3/anti-CD28, por ejemplo, recubierto en perlas magnéticas. En tales ensayos, los cultivos que incluyen menos células CAR+ entre las células T del cultivo pueden mostrar un nivel relativo más alto de la medida.

[0657] La Tabla E2 establece una lista de una pluralidad de atributos seleccionados de manera imparcial de entre los atributos que habían sido evaluados para composiciones celulares terapéuticas y/o dosis de las mismas administradas a los sujetos en los estudios. Estos atributos se evaluaron mediante un análisis univariante para un subconjunto (22) de los sujetos que habían presentado enfermedad morfológica al inicio del tratamiento. La Tabla E2 enumera los valores p que indican el grado en que se observó que cada atributo se correlacionaba (directamente (+) o inversamente (-)), basándose en un análisis univariante, con el grado de neurotoxicidad y/o edema cerebral (comparando neurotoxicidad de grado 5/edema cerebral frente a otros sujetos). Entre 15 de los sujetos, también se evaluó el grado en que cada atributo se correlacionaba o no con el resultado de la respuesta (evaluado comparando los sujetos que alcanzaron una respuesta completa (CR) o ninguna respuesta (NR)); en la Tabla E2 también se enumeran los valores p para esta comparación.

[0658] Los parámetros listados en la Tabla E2 están ordenados de menor a mayor valor p, en orden descendente, basado

en la comparación estadística univariante entre un atributo dado y neurotoxicidad/edema cerebral (Neurotoxicidad de Grado 5/CE vs. Neurotoxicidad de Grado 4). Neurotoxicidad de grado 4 o inferior). En el caso de los parámetros para los que los valores p con respecto al grado de neurotoxicidad fueron inferiores o iguales a 0,2, la Tabla E2 indica además si la relación observada con la neurotoxicidad fue directa ((+), lo que indica que se observó que el nivel o medida promedio para el parámetro fue mayor en sujetos con neurotoxicidad y edema cerebral de grado 5, en comparación con aquellos con neurotoxicidad de grado 4 o inferior) o fue inversa (-), lo que indica que se observó que el nivel o medida promedio para el parámetro fue menor en sujetos de grado 5).

[0659] Las FIGS. 3A a FIG. 3U muestran gráficos para un subconjunto de parámetros en los que se observaron relaciones (directas o inversas) entre el parámetro y la neurotoxicidad de grado 5, representando los resultados para sujetos individuales en diferentes grupos de neurotoxicidad o respuesta. Los valores p observados para estas parcelas con respecto a la neurotoxicidad fueron de 0,05 o inferiores.

[0660] La FIG. 3V muestra un gráfico que compara una medida del número de células CD3+CAR+/kg (dosis) administradas a los sujetos y si un sujeto desarrolló neurotoxicidad de grado 5 (lado derecho) y/o alcanzó una respuesta completa (lado izquierdo). Aunque se observó una relación entre las dos variables, las células CD3+CAR+/kg no fueron un factor predictivo fuerte de neurotoxicidad de grado 5, y no se observó un margen de seguridad claro. Los resultados son coherentes con la interpretación de que definir la dosis basándose únicamente en el número o la frecuencia de CD3+CAR+, sin tener en cuenta otros parámetros como la representación de células biológicamente activas (por ejemplo, no apoptóticas) y/o células CD8 frente a CD4, puede no ser adecuado para prevenir el riesgo de neurotoxicidad grave, y con la ventaja de desarrollar estrategias de dosificación que tengan en cuenta uno o más parámetros predictivos como los observados en el presente documento.

[0661] Las FIGS. 4, 5A y 5B muestran gráficos y valores p para medidas de secreción específica de antígeno de citoquinas individuales (TNFalfa, IFNgamma, IL-2), para sujetos individuales en los diferentes grupos de neurotoxicidad o respuesta.

[0662] Como se muestra, se observó que varios de los parámetros evaluados en las composiciones y dosis de células terapéuticas se correlacionaban significativamente (directa o inversamente) con el desarrollo de neurotoxicidad de grado 5 tras la administración de la composición al sujeto.

Tabla E2: Evaluación de los parámetros de las composiciones y/o dosis de células terapéuticas y correlaciones con la neurotoxicidad y los resultados de respuesta.

	Grado de Neurotoxicidad (Gr. 5 vs. Gr. 4 o más bajo)		Respuesta (CR o CRI)	
Número de células de anexina- CD8+ que expresan CAR administradas	valor p	0 (+)	valor p	0.164
ICS : IL13 of CD8+CAR+	valor p	0.001 (-)	valor p	0.912
Número de células anexina- CD8+ que expresan CAR /kg	valor p	0.001 (+)	valor p	0.13
Frecuencia de células CD127+ entre CD4+CAR+	valor p	0.004 (-)	valor p	0.426

	Grado de Neurotoxicidad (Gr. 5 vs. Gr. 4 o más bajo)		Respuesta (CR o CRI)	
Células totales infundidas por KG	valor p	0.007 (+)	valor p	0.824
Número de células que expresan CD8+CAR negativas de caspasa activa administradas	valor p	0.007 (+)	valor p	0.498
ICS : IL13 of CD4+CAR+	valor p	0.011 (-)	valor p	0.654
Frecuencia de células anexina V+ entre las células CD8+CAR+	valor p	0.012 (-)	valor p	0.056
FOXP3 por QPCR	valor p	0.012 (+)	valor p	
Número de células que expresan anexina V- CD3+CAR administradas	valor p	0.012 (+)	valor p	0.056
Número de células anexina V- CD3+CAR administradas / KG	valor p	0.015 (+)	valor p	0.1
Concentración de células viables (VCC)	valor p	0.017 (+)	valor p	0.859
Células totales infundidas	valor p	0.017 (+)	valor p	0.859
ICS : IL2 de CD4+CAR+	valor p	0.019 (-)	valor p	0.738
Frecuencia de células anexina V+ entre CD3+CAR+	valor p	0.024 (-)	valor p	0.164
Frecuencia de FOXP3+ entre CD4+CAR+	valor p	0.03 (+)	valor p	0.912
Frecuencia de CD3+	valor p	0.033 (+)	valor p	0.806
Células CD8+ totales que expresan CAR administradas / KG	valor p	0.037 (+)	valor p	0.738

	Grado de Neurotoxicidad (Gr. 5 vs. Gr. 4 o más bajo)		Respuesta (CR o CRI)	
Producción de IL-10 específica de No antígeno/CAR por células totales (estimación CD3/28)	valor p	0.04 (+)	valor p	1
ICS : TNFA de CD4+CAR+	valor p	0.044 (-)	valor p	0.953
ICS : TNFA de CD8+CAR+	valor p	0.044 (-)	valor p	0.498
Producción de IL-6 específica de No antígeno/CAR por células totales (estimación CD3/28)	valor p	0.045 (+)	valor p	NaN
Producción de IFNgamma específica de No antígeno/CAR por células totales (estimación CD3/28)	valor p	0.055 (+)	valor p	0.25
Frecuencia de células que expresan PD1 entre las células CD4+CAR+	valor p	0.055 (+)	valor p	0.076
Medición de la producción de IL-10 después del cultivo específico de antígeno CAR	valor p	0.057 (+)	valor p	0.722
Frecuencia de Anexina V+ entre CD4+CAR+	valor p	0.067 (-)	valor p	0.164
Frecuencia de células PD1+ entre CD8+CAR+	valor p	0.067 (+)	valor p	0.36
Frecuencia de CD3+CAR+ entre las células en la dosis	valor p	0.08 (-)	valor p	0.738
Células CD3+CAR+ administradas / KG	valor p	0.08 (+)	valor p	0.574
Células CD8CAR totales en la dosis	valor p	0.08 (+)	valor p	0.654

	Grado de Neurotoxicidad (Gr. 5 vs. Gr. 4 o más bajo)		Respuesta (CR o CRI)	
Producción de sCD137 específica de No antígeno/CAR por células totales (estimación CD3/28)	valor p	0.085 (+)	valor p	0.592
Frecuencia de células T de memoria efectoras entre CD8+CAR+	valor p	0.094 (+)	valor p	0.912
Número de células CD3+CAR+ negativas de escisión de caspasa 3 administradas	valor p	0.094 (+)	valor p	0.738
Frecuencia de células de fenotipo sin tratamiento previo entre las células CD8+CAR+	valor p	0.094 (+)	valor p	0.654
Frecuencia de células CD27+CD28+ entre las células CD8+CAR+	valor p	0.111(+)	valor p	0.203
Frecuencia de CD4+CAR+ por células en la dosis	valor p	0.126 (-)	valor p	0.906
Frecuencia de fenotipo de memoria elector entre CD3+CAR+	valor p	0.13(+)	valor p	1
Número de células anexina V- CD4+CAR+ administradas / KG	valor p	0.13 (+)	valor p	0.13
Medición de la producción de TNFalfa después del cultivo específico de antígeno CAR	valor p	0.15 (+)	valor p	0.654
Número de células anexina V- CD4+CAR+ administradas	valor p	0.15 (+)	valor p	0.1
Medición de la producción de sCD137 después de después del cultivo específico de antígeno	valor p	0.168 (+)	valor p	0.635

	Grado de Neurotoxicidad (Gr. 5 vs. Gr. 4 o más bajo)		Respuesta (CR o CRI)	
CAR				
Medición de la producción de IFNG después del cultivo específico de antígeno CAR	valor p	0.174 (+)	valor p	1
Producción de IL-4 específica de No antígeno/CAR por células totales (Estimación CD3/CD28)	valor p	0.174 (+)	valor p	0.912
Células CD3+CAR+ totales administradas	valor p	0.174 (+)	valor p	0.824
Número de copias de vector (Por genoma)	valor p	0.177 (-)	valor p	0.498
Medición de la producción de MIP1B después del cultivo específico de antígeno CAR	valor p	0.199 (+)	valor p	0.824
Producción de MIP1b específica de No antígeno/CAR MIP1b por células totales (Estimación CD3/CD28)	valor p	0.199 (+)	valor p	0.824
ICS : IL2 de CD8+CAR+	valor p	0.199 (-)	valor p	0.426
Medición de la producción de IL-2 después del cultivo específico de antígeno CAR	valor p	0.199 (+)	valor p	0.824
Frecuencia de CD27+ CD28+ entre las células CD3+CAR+	valor p	0.199 (+)	valor p	0.25
Relación CD4 / CD8	valor p	0.199 (-)	valor p	0.824
Expansión de plegamiento: INOC 0 a Pre-Cosecha	valor p	0.199 (-)	valor p	0.498

	Grado de Neurotoxicidad (Gr. 5 vs. Gr. 4 o más bajo)		Respuesta (CR o CRI)	
Endotoxina	valor p	0.217	valor p	0.192
Producción de TNF α específica de No antígeno/CAR por células totales (Estimación CD3/CD28)	valor p	0.227	valor p	0.738
ICS : IFNG de CD8+CAR+	valor p	0.227	valor p	0.301
Frecuencia de CD8+ en la dosis	valor p	0.227	valor p	0.824
Producción de IL-2 específica de No antígeno/CAR por células totales (Estimación CD3/CD28)	valor p	0.257	valor p	0.738
Frecuencia de CD127+ entre las células CD8+CAR+	valor p	0.257	valor p	0.1
Frecuencia de fenotipo sin tratamiento previo entre CD3+CAR+	valor p	0.257	valor p	0.574
Frecuencia de LAG3+ entre CD4+CAR+	valor p	0.253	valor p	0.301
Frecuencia de CD4+ en la dosis	valor p	0.253	valor p	0.824
Producción de MIP1 α específica de No antígeno/CAR por células totales (Estimación CD3/CD28)	valor p	0.29	valor p	0.738
Frecuencia de células CD27- CD28+ entre CD8+CAR+	valor p	0.29	valor p	0.426
Medición de la producción de MIP1 α en el cultivo específico de antígeno CAR	valor p	0.325	valor p	1

	Grado de Neurotoxicidad (Gr. 5 vs. Gr. 4 o más bajo)		Respuesta (CR o CRI)	
ICS : IFNG de CD4+CAR+	valor p	0.325	valor p	0.426
Frecuencia de Temra CD4+CAR+	valor p	0.325	valor p	0.824
Frecuencia de CD27- CD28- de CD4+CAR+	valor p	0.325	valor p	0.301
Medición de la actividad citolítica	valor p	0.351	valor p	0.906
Medición de la producción de IL-4 en el cultivo específico de antígeno CAR	valor p	0.363	valor p	0.912
Medición de la producción de IL-6 en el cultivo específico de antígeno CAR	valor p	0.391	valor p	0.514
Frecuencia de CD27- CD28- entre CD8+CAR+	valor p	0.403	valor p	0.426
Frecuencia de CD27+ CD28- entre CD3+CAR+	valor p	0.403	valor p	1
ICS: IL17 de CD4+CAR+	valor p	0.446	valor p	0.498
CD27- CD28+ entre CD3+CAR+	valor p	0.446	valor p	0.912
Frecuencia de CD25+ entre CD4+CAR+	valor p	0.456	valor p	0.514
Medición de la producción de GM-CSF en el cultivo específico de antígeno CAR	valor p	0.491	valor p	1
Frecuencia de células sin tratamiento previo entre CD4+CAR+	valor p	0.491	valor p	0.738
Frecuencia de CD25+ entre CD8+CAR+	valor p	0.502	valor p	0.738

	Grado de Neurotoxicidad (Gr. 5 vs. Gr. 4 o más bajo)		Respuesta (CR o CRi)	
Número de copias de vector (Por genoma CAR+)	valor p	0.531	valor p	0.941
CD27-CD28- entre CD3+CAR+	valor p	0.538	valor p	0.574
Número de células CD4CAR administradas / Kg	valor p	0.538	valor p	0.498
Número de células CD4CAR administradas	valor p	0.538	valor p	0.25
Frecuencia de fenotipo Tem entre las células CD8+CAR+	valor p	0.587	valor p	0.426
Frecuencia de fenotipo CD27+ CD28- entre CD8+CAR+	valor p	0.602	valor p	0.824
Viabilidad celular en la composición terapéutica	valor p	0.628	valor p	0.813
Frecuencia de fenotipo Tem entre las células CD8+CAR+	valor p	0.638	valor p	0.426
Frecuencia de CD8+CAR+ en la dosis	valor p	0.682	valor p	0.953
Fenotipo Ki67+ entre las células CD8+CAR+	valor p	0.709	valor p	1
Fenotipo Tem entre CD4+CAR+	valor p	0.794	valor p	0.906
Producción de GMCSF específica de No antígeno/CAR por células totales (Estimación CD3/CD28)	valor p	0.801	valor p	0.654
ICS : IL17 de CD8+CAR+	valor p	0.801	valor p	0.912
Frecuencia de Ki67+ entre células CD4+CAR+	valor p	0.881	valor p	0.407

		Grado de Neurotoxicidad (Gr. 5 vs. Gr. 4 o más bajo)		Respuesta (CR o CRI)	
5					
	Frecuencia de LAG3+ entre las células CD8+CAR+	valor p	0.911	valor p	0.813
10					
	Medición de la producción de IL-13 en el cultivo específico de antígeno CAR	valor p	0.914	valor p	1
15					
	Frecuencia de fenotipo Tem entre CD4+CAR+	valor p	0.914	valor p	0.574
20					
	Fenotipo CD27+ CD28- entre CD4+CAR+	valor p	0.914	valor p	0.301
25					
	Fenotipo CD27- CD28+ entre CD4+CAR+	valor p	0.914	valor p	0.912
30					
	Fenotipo FOXP3+ entre CD8+CAR+	valor p	0.97	valor p	0.594
35					
	Fenotipo CD27+ CD28+ entre CD4+CAR+	valor p	0.97	valor p	0.953
40					
	Producción de IL-13 específica de No antígeno/CAR por células totales (Estimación CD3/CD28)	valor p	0.971	valor p	0.574
45					
	Frecuencia de fenotipo Tem entre CD3+CAR+	valor p	0.971	valor p	0.25
50					
	Frecuencia de Tem entre CD3+CAR+	valor p	0.971	valor p	0.426
55					
	Medición de la producción de IL-5 en el cultivo específico de antígeno CAR	valor p	1	valor p	0.906
60					
	Producción de IL-5 específica de No antígeno/CAR por células totales (Estimación CD3/CD28)	valor p	1	valor p	0.553

[0663] Se observó que las relaciones observadas en este estudio con respecto al número de copias del vector (por célula o por genoma) se consideraban indicadores sustitutos de la aptitud celular y/o variables múltiples que se asociaban con la representación relativa de células manipuladas o no en la composición y/o la densidad de células totales en la composición. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células procedentes de muestras de sangre que en general estaban menos sanas al inicio del proceso tenían menos probabilidades de sobrevivir durante la fase de transducción y/o la muerte celular durante la transducción puede mejorar la eficacia de la transducción. Así, en algunos aspectos, en

algunos casos, un mayor número de copias de un vector vírico por composición, como el introducido mediante transducción por vectores lentivirales o gammaretrovirales, puede indicar composiciones en las que un mayor porcentaje de células no eran sanas al inicio del proceso y, en algunos aspectos, pueden haber tenido propiedades que se correlacionen, por ejemplo, inversamente, con la neurotoxicidad. En algunas realizaciones, una mayor frecuencia de transducción puede dar lugar a una composición que tenga una mayor frecuencia de células de ingeniería (por ejemplo, CAR+) durante la criopreservación, almacenamiento y descongelación. En algunos aspectos, cuando la dosis se basa en el número de células manipuladas (o subtipo de las mismas, por ejemplo, CAR+CD3+), dichas composiciones con mayor frecuencia de células manipuladas pueden incluir densidades celulares globales más bajas, lo que en algunas realizaciones se correlaciona con niveles o frecuencia reducidos de células biológicamente activas o no apoptóticas.

[0664] Los resultados de este análisis univariado identificaron varios parámetros de dosis y/o la composición celular terapéutica que se observó que se correlacionaban significativamente (directa o inversamente) con el desarrollo de neurotoxicidad de grado 5 / edema cerebral. Entre dichos parámetros se encontraban los indicativos del número, número por peso del paciente y/o frecuencia de células que tenían un fenotipo generalmente indicativo de células biológicamente activas, como células T CAR+ no apoptóticas o células T CAR+CD8+ no apoptóticas administradas en la dosis. Se observó que varios parámetros que se correlacionaban con la neurotoxicidad de grado 5 no se correlacionaban significativamente con el resultado de la respuesta al tratamiento (en este caso, si el sujeto lograba o no una respuesta completa o ninguna respuesta). En varios casos, se observó que un número de sujetos que alcanzaron CR tenían niveles de estos parámetros que estaban por debajo (para la correlación directa) de un nivel umbral correspondiente al número más bajo (para la correlación directa) observado entre los sujetos que desarrollaron el efecto no deseado, como neurotoxicidad de grado 5. Por ejemplo, los resultados indicaron que el número de células CD3+ y/o CD8+ biológicamente activas o no apoptóticas que expresan el CAR podría utilizarse para determinar una dosis dentro de los límites de seguridad y eficacia para reducir el riesgo de neurotoxicidad y estar dentro del intervalo en el que se habían observado respuestas. No se identificó ninguna asociación entre la neurotoxicidad mortal y el estado de diferenciación de las células T u otros fenotipos.

[0665] Se observó que varias medidas de número(s) o números normalizados de células que eran negativas para la tinción de superficie para marcadores de apoptosis (incluyendo Anexina V), en las dosis administradas al sujeto (o frecuencia de tales células negativas para marcadores apoptóticos entre las células del producto como entre CAR+CD3+ o CAR+CD8+) se correlacionaban con neurotoxicidad. En general, se observaron resultados similares para la anexina V y la caspasa 3. Aunque también puede considerarse que dichos parámetros están relacionados con la función o la potencia de una composición de células CAR-T y, por tanto, puede esperarse que estén relacionados con la eficacia, en general no se observó que estas variables estuvieran significativamente correlacionadas con el resultado de la respuesta al tratamiento, en este caso si el sujeto lograba o no una respuesta completa (véanse, p. ej., las FIGs. 2-5).

[0666] Los resultados fueron consistentes con el uso de la frecuencia o el número de células T no apoptóticas (y/o biológicamente activas) o células CAR+ o subconjunto(s) de las mismas (según lo indicado por diversas medidas) como un parámetro predictivo de neurotoxicidad de grado 5 o edema cerebral y/o de la gravedad de la neurotoxicidad, y el uso de dicho(s) parámetro(s) para determinar la dosis apropiada y/o los límites de seguridad apropiados para la terapia CAR-T.

Ejemplo 2: Análisis multivariante de los parámetros de las composiciones de células T CAR+ que son predictivos de neurotoxicidad grave y/o edema cerebral.

[0667] Los análisis univariantes suelen considerar una covariable cada vez. Los análisis multivariantes consideran múltiples covariables a la vez y/o en combinación, y generalmente pueden tener en cuenta la covarianza, es decir, la interacción entre las covariables.

[0668] Se realizaron análisis multivariantes para identificar combinaciones de parámetros (entre los evaluados individualmente en el análisis univariante) que se correlacionaban fuertemente y/o tenían un alto valor predictivo para los resultados clínicos y/o de toxicidad.

[0669] Se realizó un análisis recursivo de árbol de partición de dos factores para analizar diferentes combinaciones de atributos. En concreto, el conjunto de datos combinados del análisis univariante, que incluye aproximadamente 250 covariables (parámetros), se examinó mediante un enfoque basado en particiones (algorítmico, árbol de decisión) para la clasificación binaria. En general, los métodos de regresión clásicos generan relaciones funcionales (lineales y no lineales) que suelen ser más adecuadas para los datos fisicoquímicos y/o la *comprobación de hipótesis*. Los métodos de partición suelen generar modelos *algorítmicos* ("de árbol") que, en algunas realizaciones, pueden ser más adecuados para los datos biológicos y el análisis exploratorio. En comparación con técnicas de minería de datos como las máquinas de vectores de apoyo (SVM) y las redes neuronales artificiales (ANN), los modelos de partición pueden resultar ventajosos por su facilidad de interpretación.

[0670] Los modelos de partición generalmente incluyen bins / buckets anidados "if-then-else", por ejemplo, que predicen respuestas promedio. En algunas realizaciones, dado que los métodos de partición no asumen un modelo *a priori*, son más útiles para evaluar mediciones ruidosas o subjetivas, no linealidades y conjuntos de datos con tipos de datos mixtos (es decir, variables predictoras y de respuesta que son categóricas y/o continuas).

[0671] En general, los enfoques basados en árboles son no paramétricos y, en comparación con otros métodos multivariantes, están mejor equipados para manejar mediciones ruidosas y subjetivas, combinación de variables continuas y categóricas y relaciones no lineales.

5 **[0672]** En el planteamiento de este estudio, se consideraron los datos del grupo total de 38 sujetos y, por separado, los de un grupo de 24 sujetos morfológicos. Las correlaciones con la neurotoxicidad se evaluaron agrupando a los pacientes de tres formas diferentes: según si los sujetos desarrollaron o no neurotoxicidad de grado 5, según si desarrollaron o no neurotoxicidad de grado 4 o 5, y según si desarrollaron neurotoxicidad de grado 4, 5 o neurotoxicidad prolongada (10 días o más) de grado 3 (3p). La complejidad del modelo se redujo al mínimo utilizando combinaciones de, como máximo, dos covariables (un predictor principal y un predictor secundario) cada vez y manteniendo el tamaño de las divisiones en un mínimo de cinco observaciones.

10 **[0673]** Se realizó una búsqueda iterativa, en la que se generaron varios modelos alternativos utilizando el (mismo) mejor predictor primario y varios predictores secundarios, siempre que el número de falsos positivos y falsos negativos fuera satisfactoriamente pequeño. A continuación, la búsqueda consideraba el siguiente mejor predictor primario y se repetían los pasos. Se evaluaron varios modelos alternativos y se comprobó que los mejores modelos (los que presentaban un menor número de falsos positivos y falsos negativos) utilizaban sistemáticamente covariables similares.

15 **[0674]** Pares particulares de parámetros observados por este método para tener un fuerte poder predictivo para la severidad de la neurotoxicidad (por ejemplo, neurotoxicidad de grado 5). Entre dichos pares se encontraban combinaciones de números, o números normalizados, de poblaciones celulares particulares (como CAR+CD3+no apoptóticas o CAR+CD8+ no apoptóticas) en la dosis administrada y un indicador de la actividad específica del antígeno CAR en la composición terapéutica, como las citocinas proinflamatorias. Entre dichos pares se encontraba la combinación del número de células CD8+ expresantes de CAR con marcador apoptótico negativo administradas al sujeto, en combinación con un parámetro indicativo de la producción de TNF-alfa medido por acumulación en el sobrenadante tras un co-cultivo de 18 horas de una muestra de la composición celular terapéutica que contenía $0,25 \times 10^6$ células CD3+CAR+ en co-cultivo con células expresantes de CD19 en una proporción 1:1 (véanse las Figuras 6A y 6B). Se observaron resultados similares para otras citocinas proinflamatorias como IFN-gamma e IL-2 en lugar de TNF-alfa.

20 **[0675]** No se observó que estas combinaciones de variables predijeran fuertemente la respuesta (medida por CR vs. no CR) en este estudio, ni inversa ni directamente (ver, por ejemplo, Figuras 9, 11, 13). Además, varios de los sujetos que alcanzaron CR or CRi en el estudio descrito en el Ejemplo 1 habían recibido dosis del producto celular que contenían números (o números normalizados) de células CD8+CAR+ marcadoras apoptóticas que estaban por debajo del número más bajo (o número normalizado) en cualquier dosis administrada entre los sujetos que llegaron a desarrollar neurotoxicidad/edema cerebral de grado 5. Del mismo modo, a varios sujetos que lograron CR se les habían administrado composiciones celulares que, según se determinó mediante el ensayo, tenían niveles de producción de citocinas específicas del antígeno CAR (por ejemplo, TNF-a, IFN-g, IL-2) inferiores a los más bajos observados entre las composiciones administradas a cualquiera de los sujetos que desarrollaron neurotoxicidad/edema cerebral de grado 5 (véanse, por ejemplo, las Figuras 4 y 5).

25 **[0676]** Los resultados del análisis post-facto de otro ensayo fueron consistentes con la utilidad de los pares de covariables identificados para determinar la dosis y predecir la neurotoxicidad. Se analizaron los resultados tras la administración de composiciones celulares anti-CD19 CAR similares en otro estudio clínico a un subconjunto (11 de 31) de sujetos (seleccionados por su representatividad en un intervalo de respuestas diferentes) con ALL en adultos en recaída o refractaria, en busca de medidas de ciertos parámetros considerados correlacionados o inversamente correlacionados con los resultados de neurotoxicidad en el estudio anterior. De los 31 sujetos, el 77% había experimentado CR or CRi, con tasas de 61% de recaída y 27% de trasplante de células madre (SCT) entre los sujetos con CR/CRi. El 42 % experimentó CRS de grado 3 o superior y el 35 % presentó neurotoxicidad de grado 3 o 4; ninguno de los 31 sujetos experimentó neurotoxicidad de grado 5 o edema cerebral.

30 **[0677]** Ciertos parámetros fueron evaluados y comparados para sujetos y composiciones celulares en este otro estudio, generalmente como se describió anteriormente, incluyendo el número de células CD8+ expresantes de CAR con marcador apoptótico negativo administradas y el mismo parámetro de actividad antígeno-específica (la misma medida de acumulación de TNF-alfa en un ensayo que involucra co-cultivo con células CD19 expresantes como se usó anteriormente). Los resultados se muestran en la FIG. 7 y FIG. 6B. Para la dosis administrada a cada uno de los 11 sujetos evaluados del otro estudio clínico similar -ninguno de los cuales presentó neurotoxicidad de grado 5 o edema cerebral-: (i) el número de células CD8+ con marcadores apoptóticos negativos y que expresan CAR, fue inferior al número más bajo de tales células en una dosis administrada a cualquier sujeto con neurotoxicidad de grado 5 en el estudio anterior y/o (ii) el nivel del parámetro indicativo de la actividad inducida por CAR (por ejemplo, medida de la producción de TNF-alfa) (B) fue inferior al nivel más bajo observado en dosis para sujetos de grado 5 en el estudio anterior. Como se muestra en la FIG. 6B, el intervalo general del perfil del producto para este ensayo entre una mayoría de sujetos en el otro estudio evaluado estaba por debajo de tal nivel indicativo de actividad inducida por CAR, como se indica por el óvalo sombreado.

35 **[0678]** Así, entre los sujetos de otro estudio con una composición celular expresiva de CAR similar, ninguno de los cuales había desarrollado neurotoxicidad de grado 5, una o ambas de las covariables en el par predictivo de neurotoxicidad estaba por debajo del nivel observado para cualquier paciente que experimentara la toxicidad. Se observaron resultados

similares cuando se evaluó el IFNg o la IL-2 en lugar del TNF-alfa. Los resultados son coherentes con la interpretación del uso de una combinación de un atributo funcional (grado de actividad específica del antígeno CAR evaluado por la secreción de citoquinas proinflamatorias tras el co-cultivo con células que expresan el antígeno) y el número (o número por peso) de células CAR+CD8+ no apoptóticas para determinar o evaluar la dosis adecuada para minimizar el riesgo o la gravedad de la neurotoxicidad.

[0679] Los resultados de los estudios fueron consistentes con las ventajas de usar un enfoque compuesto para definir una dosis unitaria apropiada para la administración de composiciones CAR-T. Por ejemplo, los resultados son coherentes con la utilidad de un enfoque en el que la dosis unitaria se basa en dos o más parámetros y/o en el que la liberación de la dosis unitaria que debe administrarse se produce sólo después de tener en cuenta cualquier variabilidad a la que potencialmente podría contribuir cada uno de esos dos o más parámetros. Por ejemplo, los resultados son coherentes con las ventajas de administrar dosis unitarias y/o identificar la dosis adecuada, en la que la dosis (A) se relaciona con el número o la cantidad de células de un fenotipo concreto (como CD3+CAR+, CD8+CAR+ o CD8+CAR+marcador apoptótico negativo) y el otro de o el número compuesto de células de fenotipos múltiples, que (B) indica una actividad inducida/dependiente de CAR y/o específica de antígeno, como la producción inducida por CAR de citocina proinflamatoria. Los resultados fueron coherentes con la utilidad de un enfoque compuesto en el que (1) se administra un número objetivo de células (A), siempre que la medida de la actividad (B) esté por debajo de un determinado número umbral (basado en correlaciones con la toxicidad), (2) se administra una dosis objetivo diferente (A) dependiendo de si B está por encima o por debajo de uno o más valores umbral dados (y opcionalmente cuando no se administran células si B está por encima de un umbral de seguridad límite superior) y/o (3) la dosis se define como un número objetivo de unidades de referencia, determinándose el número de unidades de referencia basándose en una función de A y B (por ej., $A \times B$ o función de valor(es) transformado(s) o múltiplo(s) de A y B).

[0680] Además, se observó que en algunos casos, los cambios de las condiciones de almacenamiento o manipulación o el lote de materia(s) prima(s) o reactivo(s) utilizado(s) en un proceso para producir una composición de células T de ingeniería -en un proceso de ingeniería celular por lo demás similar- parecían correlacionarse, en la composición terapéutica final, con ciertos parámetros que se observó en el presente documento que tenían una relación con la gravedad de la neurotoxicidad y/o el edema cerebral, por ejemplo, en el estudio descrito anteriormente, por ejemplo, en combinación con otra covariable. Por ejemplo, se observó que las diferencias en tales condiciones de almacenamiento o manipulación o lotes de tales materiales o reactivos se correlacionaban con cambios en ciertas medidas de actividad específica del antígeno en la composición terapéutica producida por los métodos, como por ejemplo la medida de producción de citoquinas proinflamatorias (por ejemplo, TNFalfa) en respuesta al co-cultivo con células que expresan el antígeno CAR.

[0681] Los niveles observados para las medidas de parámetros ejemplares (medida de la producción de TNF alfa específica de antígeno CAR y frecuencia del fenotipo CD27+/CD28+ entre las células CAR+) se compararon para dos grupos de composiciones celulares terapéuticas, generadas por un proceso que utilizaba dos lotes diferentes de materia prima.

[0682] Los resultados se muestran en las Figuras 23A y 23B. Como se muestra, los niveles de estos parámetros variaron entre las muestras. Se observó un nivel medio más elevado de cada parámetro en las composiciones celulares generadas mediante el proceso que utiliza un lote (lote 2) de la materia prima, en comparación con las generadas mediante un proceso comparable que utiliza otro lote (lote 1) del mismo reactivo (TNFa: $p=0,066$); (frecuencia CD27+/CD28+: $p=0,018$). La Figura 23B indica además el grado de neurotoxicidad/edema cerebral desarrollado por el sujeto al que se administró cada composición celular individual. Entre los 15 sujetos, se habían observado grados más altos de neurotoxicidad/edema cerebral entre los sujetos a los que se habían administrado composiciones celulares producidas utilizando el lote 2 del reactivo.

[0683] En otro ejemplo, también se observó que el almacenamiento y/o manipulación de reactivos afectaba a los parámetros entre dos grupos de composiciones celulares terapéuticas, generadas por un proceso que utilizaba los mismos medios de cultivo celular, utilizados con dos condiciones diferentes de almacenamiento y/o manipulación en un proceso de ingeniería celular por lo demás similar. Se evaluó la producción de TNF-alfa en dos grupos de composiciones de células terapéuticas generadas a partir de los mismos medios almacenados en cada condición, en respuesta al co-cultivo con células que expresaban el antígeno CAR. Como se muestra en la Figura 23C, los niveles de producción de TNF-alfa variaron entre las muestras. Se observó una tendencia a una menor producción de TNF-alfa en las composiciones celulares generadas utilizando medios almacenados en la primera condición de almacenamiento en comparación con las generadas utilizando los mismos medios almacenados en la segunda condición de almacenamiento.

[0684] Las observaciones fueron consistentes con la interpretación de que puede ser ventajoso - por ejemplo, en la identificación de una dosis de composición celular segura y eficaz - considerar (por ejemplo, ensayar antes de la liberación del producto y/o factor en la estrategia de dosificación) el grado de variabilidad en los factores que pueden contribuir a ciertas actividades específicas de células/antígenos en una composición, desde la perspectiva de composiciones producidas a partir de células derivadas de diferentes sujetos, y/o en presencia de una o más condiciones diferentes de almacenamiento o manipulación de materias primas o reactivos, por ejemplo, utilizando diferentes lotes de reactivos u otras materias primas. Los resultados ponen de relieve ciertas ventajas de las realizaciones aquí expuestas. En algunos aspectos, es ventajoso reducir la variabilidad en tales parámetros y/o confirmar el intervalo aceptable de variabilidad entre

tales condiciones/lotos diferentes, como cuando se introduce un nuevo lote o reactivo almacenado o manipulado en condiciones diferentes, como cuando se usa un ensayo de liberación que prueba uno o más parámetros de composiciones celulares hechas usando un proceso que incorpora tales cambios, como aquellos parámetros observados en el presente documento que se asocian con riesgo de neurotoxicidad, para evitar la variabilidad en tales parámetros, por ejemplo, en diferentes dosificaciones o productos celulares.

[0685] En algunas realizaciones, los métodos, artículos de fabricación, composiciones, dosis y estrategias de dosificación proporcionados son ventajosos porque tienen en cuenta y, en su caso, ajustan o corrigen las fuentes potenciales de variabilidad, incluidas las derivadas del cambio en los reactivos y/o la variabilidad de paciente a paciente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, puede ser ventajoso producir células T de ingeniería mediante un proceso que implique el uso de un reactivo de estimulación/expansión de células T (o lote del mismo) que se haya verificado mediante un ensayo de liberación que esté por debajo o dentro de un intervalo aceptable de varianza en comparación con un nivel umbral de un parámetro, por ejemplo, actividad específica con respecto a dicho parámetro de la composición terapéutica (como medida de la cantidad o cantidad relativa del reactivo necesaria para inducir un grado particular de la actividad específica del antígeno en la composición final de células T producida por el proceso de ingeniería de células T, por ejemplo, en comparación con un reactivo de control o unidad estándar con respecto a dicho ensayo). En algunas realizaciones, las realizaciones proporcionadas implican dosis de células en las que las células se han producido mediante un proceso que implica un ensayo de liberación para confirmar que cualquier variabilidad en dicho parámetro de actividad específico (por ejemplo, medida de citocina inflamatoria específica de antígeno) se encuentra dentro de un intervalo aceptable y/o por debajo de un límite superior de especificación. En algunas realizaciones, los procesos proporcionados incluyen dicho ensayo de liberación. En algunas realizaciones, la producción de las composiciones celulares se lleva a cabo utilizando reactivos y/o procesos en los que la varianza de dichos parámetros se encuentra dentro de un intervalo aceptable. En algunas realizaciones, los métodos, composiciones y artículos de fabricación proporcionados son ventajosos porque utilizan estrategias de dosificación y/o producción celular que mitigan el riesgo asociado con la varianza potencial en dichos parámetros de actividad específicos, por ejemplo, minimizando la variabilidad en un segundo parámetro que, junto con el parámetro de actividad específico, se correlaciona con el riesgo de toxicidad. Por ejemplo, al minimizar la varianza en la frecuencia de células biológicamente activas o sanas (por ejemplo, células no apoptóticas) producidas por un proceso, se pueden minimizar los impactos en los cambios de parámetros específicos relacionados con la actividad sobre la seguridad. En algunas realizaciones, una dosis o estrategia de dosificación que incluye característica(s) relacionada(s) con el número o frecuencia de células biológicamente activas o no apoptóticas, tales como células de ingeniería biológicamente activas o no apoptóticas o células CD8+ de ingeniería, reduce el riesgo asociado con la varianza en los parámetros de actividad específicos del antígeno. En algunos aspectos, esto se consigue mediante dosis que incluyen un límite superior de dichas células y/o que definen la dosis basándose en unidades de referencia, por ejemplo, basándose en una fórmula que tiene en cuenta el número de células biológicamente activas.

[0686] Las composiciones administradas a sujetos en el estudio del Ejemplo 1 se compararon con composiciones producidas por un proceso alternativo para producir células T de ingeniería, a partir de muestras de sangre derivadas de sujetos que tenían LNH recidivante o refractario. El proceso consistió en generar y mezclar por separado, en una proporción aproximada a la deseada, poblaciones CD4+ y CD8+ de células T modificadas derivadas del mismo sujeto. Cada población se generó mediante un proceso similar que implicaba el uso de diferentes factores y reactivos, incluidas las citoquinas, por ejemplo, durante la activación, la transducción (que implicaba el uso de un vector lentiviral) y/o la expansión de las células. El proceso implicaba además el llenado de contenedores de producto, la criopreservación y la descongelación de las células a una densidad celular que era comparativamente más alta que las densidades utilizadas en el proceso del estudio anterior, y que era consistente en todas las muestras (véase el Ejemplo 4). En general, el proceso permitió un mayor grado de control sobre el fenotipo, la función y el perfil metabólico de las células manipuladas en la composición final. La CAR incluía un dominio costimulador derivado de 41BB en lugar de un dominio CD28.

[0687] Se observó que entre las muestras producidas usando un proceso (por ejemplo, uno que usa proporciones controladas de subconjuntos de células T, citocinas y reactivos para permitir el control del fenotipo, función y estado metabólico) y densidad celular controlada y más alta durante la criopreservación, había menos variabilidad de sujeto a sujeto, en comparación con entre las muestras analizadas en el Ejemplo 1, en atributos de composiciones de células terapéuticas observadas en el presente documento para ser fuertemente predictivas (solas y/o en combinación) de riesgo de neurotoxicidad severa.

[0688] Por ejemplo, el proceso alternativo (B) condujo a frecuencias más altas de células biológicamente activas o sanas entre las células CD8+CAR+, según lo medido por la negatividad para varios marcadores apoptóticos entre las muestras generadas usando el proceso, en comparación con las muestras administradas como se describe en el Ejemplo 1 (véase, por ejemplo, FIG. 21A). Además, hubo un menor grado de varianza en este parámetro entre las muestras producidas por el proceso de diferentes sujetos. Como se observó aquí, el número de tales células se correlacionó con la neurotoxicidad de grado 5 y el edema cerebral, mientras que las células viables CD3+CAR+ (sin tener en cuenta el estado apoptótico frente a las células biológicamente activas) fue un predictor más pobre y no definió claramente un límite de seguridad. En algunas realizaciones, el uso de un proceso con una variabilidad reducida en la frecuencia de dichas células biológicamente activas entre las células de ingeniería, reduce el riesgo de que ciertos pacientes (por ejemplo, aquellos que tienen células menos propensas a la apoptosis o que son más sanas) reciban inadvertidamente una dosis más alta de lo previsto de células biológicamente activas, cuando la dosificación se basa en los números de células T de ingeniería en su conjunto. Se ha observado que procesos como éste, con un mayor grado de control sobre el fenotipo y la función,

reducen además el grado de variabilidad en la capacidad de las células producidas por el proceso para fabricar citocinas inflamatorias de forma específica para un antígeno (véase, por ejemplo, la FIG. 21B). Los resultados del estudio anterior son coherentes con la interpretación de que, en particular cuando se combina con un número de células de ingeniería biológicamente activas, una estrategia de dosificación que tenga en cuenta dichos parámetros de actividad específicos de la célula (por ejemplo, de modo que un intervalo objetivo específico de dicha actividad -o no más de un umbral- esté representado en una dosis dada), puede utilizarse para proporcionar una dosis capaz de lograr un resultado clínico o terapéutico deseado, al tiempo que se mantiene dentro de un margen de seguridad o se reduce el riesgo de toxicidad no deseada, por ejemplo, neurotoxicidad.

[0689] En algunas realizaciones, el uso de un proceso que produce frecuencias consistentemente más altas de células de ingeniería biológicamente activas, permite el uso de dosis celulares que son mucho más bajas (desde la perspectiva de números de células de ingeniería, por ejemplo, CAR+), en comparación con otras estrategias de dosificación, en las cuales una frecuencia más alta de células de ingeniería son positivas para marcadores apoptóticos o de otra manera son menos saludables. Por ejemplo, basándose en las observaciones del presente documento, y teniendo en cuenta la observación de que las estrategias de dosificación disponibles generalmente no han tenido en cuenta la frecuencia de células apoptóticas, en algunas realizaciones, los números de células T modificadas (por ejemplo, CAR+) (por ejemplo, células CD8+ y/o CD4+ modificadas), son tan bajos como 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40 o 50 millones de células.

Ejemplo 3: Determinación y fórmula de la unidad de dosis diana

[0690] Se identificaron y desarrollaron dosis ejemplares, intervalos de dosis, y métodos y fórmulas para dosificación y determinación de dosis, basados en combinaciones de parámetros identificados en los análisis multivariados considerados como predictivos del grado de neurotoxicidad.

[0691] Se evaluaron los datos de los treinta y ocho sujetos o sólo de los sujetos morfológicos. Se dispuso de datos de dosis para 37/38 sujetos; la correlación con la respuesta (CR frente a ausencia de CR) sólo se consideró para los pacientes con carga morfológica de la enfermedad y no se tuvo en cuenta para los sujetos que habían desarrollado neurotoxicidad de grado 5 y no eran evaluables para CR. Para los sujetos individuales, se determinó el número de unidades de referencia (UR) en la dosis administrada, donde:

$$RU=A \times B,$$

A era igual al número de células CD8+ negativas para marcadores apoptóticos que expresaban CAR, y

B era un parámetro indicativo de la actividad específica del antígeno CAR entre las células de la composición. En algunos análisis (véanse las Figs. 8-13), B era una medida indicativa del nivel de producción específica de antígeno de una citocina individual (por ejemplo, concentración por hora por número de células de entrada), o media geométrica o aritmética de dicha medida, para múltiples citocinas.

[0692] En otros análisis (ver FIGs. 14-20), B era un valor corregido indicativo de uno o más niveles de citoquinas, basado en dicha medida o medida compuesta, normalizado a una tendencia central de dicha medida entre los sujetos con neurotoxicidad de grado 0-2.

[0693] Los resultados se graficaron en una escala logarítmica para subconjuntos de sujetos agrupados según el grado de neurotoxicidad (con sujetos agrupados ya sea por si desarrollaron o no neurotoxicidad de grado 4 o 5 o si desarrollaron neurotoxicidad prolongada de grado 3 (3p), 4 o 5) y/o tasa de respuesta (CR/no CR).

[0694] Los resultados se muestran en la FIG. 8-20. En concreto, las figuras 8-13 muestran los resultados entre 38 sujetos.

[0695] Las Figuras 14, 15 y 16 muestran los resultados de RU entre 32 sujetos con enfermedad morfológica donde A era igual al número de células CD8+, negativas al marcador apoptótico, que expresan CAR B era una medida corregida de la producción antígeno-específica de una citocina individual (TNF-alfa, IFN-gamma, e IL-2, respectivamente) normalizada a una tendencia central de la medida de la citocina individual entre sujetos con neurotoxicidad de grado 0-2 (con las Figuras 14A, 15A y 16A mostrando los resultados con sujetos agrupados según el grado de neurotoxicidad y las Figuras 14B, 15B y 16B mostrando los resultados con sujetos agrupados según la respuesta (CR vs no CR)).

[0696] Se observaron separaciones en varios números RU entre agrupaciones de sujetos que exhibían diferentes grados de toxicidad. Los resultados se utilizaron para identificar números ejemplares superiores o umbrales de unidades de referencia (basados en la fórmula $RU=A \times B$) y ejemplares de RU objetivo y dosis objetivo. En algún ejemplo, el umbral o EF objetivo se identificó para estar por debajo del EF determinado entre los sujetos que habían desarrollado un grado particular de neurotoxicidad, en algunos aspectos, menos un número de EF correspondiente a una ventana de seguridad, tal como dar lugar a una disminución de 1,5 veces o 2 veces en el EF. Los gráficos que agrupaban a los pacientes en función de la respuesta eran coherentes con la conclusión de que los valores de EF objetivo y las dosis objetivo estarían dentro de ventanas de respuesta aceptables.

Ejemplo 4: Correlación de la densidad celular total en la composición crioconservada y parámetros de la composición indicativos de la función celular y otros atributos

[0697] Se examinaron los impactos de la densidad celular, por ejemplo, la concentración de células viables (VCC), durante la criopreservación y el almacenamiento de composiciones de células T terapéuticas. Se sabe que el aumento de la densidad celular en determinadas composiciones reduce la supervivencia de las células. Sin embargo, se observó en el presente documento que para algunas composiciones celulares crioconservadas para uso terapéutico, en particular las que se crioconservan a densidades celulares relativamente bajas (como por debajo del 10% del volumen celular con respecto al volumen total de congelación), el aumento de la densidad celular durante la criopreservación, almacenamiento y/o descongelación de la composición, por ejemplo, el producto terapéutico, puede ser ventajoso, por ejemplo, con respecto a la salud celular y/o la actividad y/o función biológica.

[0698] Las composiciones celulares terapéuticas crioconservadas administradas a los sujetos en el estudio clínico descrito en el Ejemplo 1 habían sido criocongeladas a diferentes densidades aproximadamente por debajo del 1 % (volumen celular como porcentaje del volumen total de congelación), con DMSO. En los estudios de evaluación de diversos parámetros anteriores, las muestras de las composiciones celulares, criopreservadas, mantenidas y descongeladas en condiciones que imitaban aquellas en las que las composiciones celulares administradas fueron mantenidas, enviadas y descongeladas, incluyendo periodos de tiempo similares.

[0699] Para evaluar los impactos de la densidad celular durante el almacenamiento y descongelación por criopreservación, se evaluaron las composiciones celulares de diferentes sujetos que habían sido criocongelados a diferentes densidades celulares (1×10^6 células por mL, 8×10^6 células por mL y 15×10^6 células por mL) y con diferentes concentraciones de DMSO (entre aproximadamente 3% y 9% de DMSO por volumen). A continuación, se descongelaron las composiciones celulares crioconservadas y se evaluó la potencia celular (evaluada mediante la medida de la citotoxicidad específica del antígeno) en las composiciones.

[0700] Los resultados mostraron que, en general, se observó un aumento de la potencia celular asociado a las mayores concentraciones celulares y/o concentraciones de DMSO durante la criopreservación. Los resultados fueron coherentes con la interpretación de que las condiciones de criopreservación pueden influir en la actividad biológica de las composiciones terapéuticas de células T.

[0701] En un estudio adicional, composiciones celulares que contenían células que expresaban un CAR anti-CD19 se criocongelaron a diferentes concentraciones (p. ej., de 1×10^6 células/ mL, 2×10^6 células/ mL, 5×10^6 células/ mL, 10×10^6 células/ mL, 20×10^6 células/ mL, 50×10^6 células/ mL, y 100×10^6 células/ mL) y 7,5% DMSO y almacenadas a 80 grados durante aproximadamente 15 horas, descongeladas, y luego analizadas para viabilidad (concentración de células viables (VCC) y diámetro, y para marcadores de apoptosis (p. ej., Anexina V y caspasa 3 activada) mediante citometría de flujo.

[0702] La pérdida observada de concentración de células viables (% Diferencia VCC) en este estudio, durante el periodo de criocongelación y descongelación, osciló entre el 10 y el 45%. No se observó ninguna tendencia general en las concentraciones para estos atributos.

[0703] Los resultados de la evaluación de los marcadores apoptóticos demostraron una tendencia general tanto en las células CD4+ CAR expresantes como en las células CD8+ CAR expresantes, observándose mayores niveles de células con marcadores apoptóticos+ después de la descongelación en las composiciones en las que las células habían sido congeladas y almacenadas a concentraciones celulares más bajas. En particular, los resultados indicaron que en el intervalo ensayado de concentraciones de DMSO, tales como 7,5 % de DMSO, en algunas realizaciones, las densidades celulares globales entre en o aproximadamente 10 y en o aproximadamente 60 millones o en o aproximadamente 15 y en o aproximadamente 60 o 70 millones de células por mL durante la criopreservación, almacenamiento y descongelación, son particularmente ventajosas para aumentar la salud celular y/o la frecuencia de células biológicamente activas en una composición tras la criopreservación y descongelación.

[0704] Los resultados son consistentes con la utilidad de mayores densidades celulares o concentraciones celulares de células CD8+ y/o células CD4+ en la criopreservación de productos de células T terapéuticas.

Ejemplo 5: Evaluación y comparación de la neuropatología en diferentes sujetos

[0705] Se realizaron evaluaciones de neuropatología por autopsia en cuatro sujetos con leucemia linfoblástica aguda (ALL) que desarrollaron neurotoxicidad grave, incluida neurotoxicidad de grado 4 o 5, y/o edema cerebral tras el tratamiento con composiciones terapéuticas que contenían células T diseñadas para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR). En concreto, los estudios de autopsia se realizaron en 2 sujetos que habían experimentado edema cerebral de grado 5 (n = 2) y en 2 sujetos que habían experimentado neurotoxicidad grave sin edema cerebral (n = 2). En general, los resultados apoyan la conclusión de que no se observó que la afectación cerebral por ALL-B fuera un factor de edema cerebral. En los dos sujetos con edema cerebral, no se observaron células inmunitarias innatas, células cancerosas B-ALL ni células cancerosas CD19+ en el SNC. Además, en los pacientes con edema cerebral, se observó

que el edema tendía a ser vasogénico, no citotóxico. En pacientes con edema cerebral, la fibrina perivascular y la extravasación de glóbulos rojos sugerían una ruptura completa de la barrera hematoencefálica (BBB). BBB se observó en estos sujetos. También se observó daño endotelial. Sin embargo, no parecía haber ninguna infiltración notable de células T, lo que permitía concluir que el edema cerebral no se había desarrollado como resultado de la infiltración y/o activación de células T CAR en el cerebro o el SNC.

[0706] Además, se observaron patrones perivasculares y más difusos de daño/activación astrocítica y microglial en cerebros de sujetos que habían desarrollado edema cerebral, indicativo de BBB. La observación era coherente con la conclusión de que la activación de la microglía contribuía al desarrollo de edema cerebral en sujetos a los que se administraba una terapia celular CAR-T. Además, se observaron daños irreversibles en los astrocitos (clasmatodendrosis) en los sujetos que desarrollaron edema cerebral, en contraste con la proliferación astrocítica observada en los sujetos que desarrollaron neurotoxicidad de Grado 4. No se observó edema significativo en los tejidos periféricos de los sujetos que presentaron edema cerebral, como pulmón, hígado o riñón. En los sujetos que desarrollaron neurotoxicidad de grado 4 no se observó la rotura completa de la BBB ni el edema vasogénico resultante.

[0707] En las autopsias de sujetos que no desarrollaron edema cerebral (n=2), se observó una infiltración difusa de células T CD8+ que no era consistente con una simple reacción a una lesión focal. Las células T estaban presentes en el SNC de estos sujetos. No se observaron indicios de patología de la barrera hematoencefálica en estos sujetos sin edema cerebral.

Ejemplo 6: Administración de Células de Expresión CAR Anti-CD19 a Sujetos con Linfoma no Hodgkiniano (NHL) Recidivante y Refractario.

[0708] Composiciones terapéuticas de células T CAR+ que contienen células T autólogas que expresan un antígeno-receptor quimérico (CAR) específico para CD19 se administraron a sujetos con neoplasias de células B. Las composiciones de células T terapéuticas administradas se habían generado mediante un proceso que incluía el enriquecimiento basado en inmunofluorescencia de células CD4+ y CD8+ a partir de muestras de leucaféresis de los sujetos individuales a tratar. Las células T CD4+ y CD8+ aisladas se activaron por separado y se transdujeron independientemente con un vector lentiviral que codificaba un CAR anti-CD19. Las células T CD4+ y CD8+ manipuladas se expandieron de forma independiente en presencia de citocinas hasta alcanzar un número umbral de células. Tras la expansión, las células se formularon y criopreservaron en un volumen bajo. El CAR contenía un scFv anti-CD19 derivado de un anticuerpo murino, un espaciador derivado de inmunoglobulina, un dominio transmembrana derivado de CD28, una región coestimuladora derivada de 4-1BB y un dominio de señalización intracelular CD3-zeta. Las composiciones celulares criopreservadas se descongelaron antes de su administración intravenosa. La dosis de células T terapéuticas se administró como una composición celular definida mediante la administración de una población de células CD4+ CAR+ formuladas y una población de células CD8+ CAR+ formuladas administradas a una proporción objetivo de aproximadamente 1: 1.

A. Sujetos y Tratamiento

Ejemplo 6.A.1

[0709] Los estudios descritos en este Ejemplo 6.A.1 describen el tratamiento y evaluación de sujetos a través de un punto de tiempo particular (6.A.1) en un estudio clínico en curso administrando dicha terapia a pacientes con Malignidades de células B. Específicamente, una cohorte (cohorte completa) de (en este momento, cincuenta y cinco (55)) sujetos humanos adultos con linfoma no Hodgkin (NHL) agresivo recidivante o refractario (R/R), incluido el linfoma difuso de grandes células B (DLBCL), de novo o transformado de linfoma indolente (NOS), linfoma mediastínico primario de grandes células B (PMBCL) y linfoma folicular de grado 3b (FLG3B) tras el fracaso de 2 líneas de tratamiento. Entre los sujetos tratados se encontraban los que tenían puntuaciones del Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) de entre 0 y 2 (mediana de seguimiento de 3,2 meses). La cohorte completa no incluía sujetos con linfoma de células del manto (LCM). No se excluyó a ningún sujeto debido a un trasplante alogénico previo de células madre (SCT), a una afectación secundaria del sistema nervioso central (CNS) o a una puntuación ECOG de 2, y no se exigió un recuento absoluto mínimo de linfocitos (ALC) para la aféresis.

[0710] Los resultados se evaluaron por separado para un subconjunto básico de sujetos dentro de la cohorte completa (sujetos dentro de la cohorte completa excluidos aquellos sujetos con un estado funcional deficiente (ECOG 2), DLBCL transformado de linfomas de zona marginal (MZL) y/o leucemia linfocítica crónica (CLL, de Richter) (cohorte básica)). En el punto temporal del ejemplo 1.A.1, se evaluaron los resultados de 44 sujetos de esta cohorte principal.

[0711] Las características demográficas y basales de los sujetos de la cohorte completa y del núcleo en el punto temporal del Ejemplo 6.A.1 se exponen en la Tabla E3.

Tabla E3. Demografía y Características de Valor de referencia		
Característica	COMPLETO N=55	NÚCLEO N=44
Edad media, años (intervalo)	61 (29-82)	61 (29-82)
≥ 65 años, n (%)	22 (40)	17 (39)
Masculino/Femenino, n (%)	38/17 (69/31)	28/16 (64/36)
Meses de la diagnosis, media (intervalo)	17 (3-259)	20 (8-259)
Subtipo B-NHL, n (%)		
DLBCL, NOS	40 (73)	35 (80)
DLBCL transformada	14 (26)	8 (18)
Folicular, Grado 3B	1 (2)	1 (2)
Subtipo Molecular, n (%)		
Acierto doble/triple	15 (27)	12 (27)
Expresor doble	6 (11)	4 (9)
Características del paciente, n (%)		
Quimiorrefractario [†]	42 (76)	34 (77)
ECOG 0-1	48 (87)	44 (100)
ECOG 2	7 (13)	0
Líneas previas de terapia, medias (intervalo)	3 (1-11)	3 (1-8)
< 5 líneas de terapia	44 (80)	37 (84)
Cualquier HSCT	27 (49)	22 (50)
Alogénica	4 (7)	3 (7)
Autóloga	24 (44)	20 (45)

[†]SD o PD para el último régimen que contiene quimio o meses <12 de recaída después del SCT autólogo

[0712] Como se muestra en la Tabla E4, se administró a los sujetos una dosis única o doble de células T que expresan CAR (cada dosis única mediante infusiones separadas de células T que expresan CAR CD4+ y células T que expresan CAR CD8+, respectivamente) como sigue: una dosis única de nivel de dosis 1 (DL-1) que contenía 5×10^7 células T que expresan CAR totales (n=30 para los sujetos evaluados en el Ejemplo 6.A.1), una dosis doble de DL1 en la que cada dosis se administró aproximadamente a los catorce (14) días (n=6 para los sujetos evaluados en el Ejemplo 6.A. 1, incluido un sujeto que recibió inadvertidamente dos dosis de DL2 mediante el esquema de dos dosis, debido a un error de dosificación), o una dosis única del nivel de dosis 2 (DL-2) que contenía 1×10^8 (DL-2) células T totales que expresaban CAR (n=18 para los sujetos evaluados en el Ejemplo 6.A.). 1). Comenzando tres (3) días antes de la infusión de células T CAR+, los sujetos recibieron una quimioterapia de linfodepleción con flurabina (flu, 30 mg/m²) y ciclofosfamida (Cy, 300 mg/m²).

Tabla E4: Niveles de dosis y número de subconjuntos de células T para composiciones celulares que contienen células T CAR anti-CD19

Nivel de dosis (DL)	Dosis de células T auxiliares (T _H) (CD4+CAR+)	Dosis de células T citotóxicas (T _C) (CD8+CAR+)	Dosis de células T totales (CD3+CAR+)
DL1	25 x 10 ⁶	25 x 10 ⁶	50 x 10 ⁶
DL2	50 x 10 ⁶	50 x 10 ⁶	100 x 10 ⁶

Ejemplo 6.A.2

[0713] Para el Ejemplo 6.A.2, en un punto posterior en el tiempo en el estudio clínico descrito en este Ejemplo anterior, se analizaron los resultados en un segundo punto temporal. En este punto temporal de análisis del Ejemplo 6.A.2, se había tratado a 74 pacientes (51 hombres, 23 mujeres). Los sujetos incluyeron sesenta y nueve (69) sujetos en la cohorte completa de DLBCL (incluidos 67 DLBCL NOS (45 de novo, 14 transformados de FL, 8 transformados de CLL o MZL), 1 FL grado 3B y 1 PMBCL), y 5 sujetos en la cohorte de MCL. Entre los sujetos de la cohorte completa (LDCBG), la mediana de edad era de 61 años (intervalo 26, 82), la mediana de terapias previas era de 3 (intervalo 1, 12), 46 (67%) eran quimiorrefractarios, 32 (46%) tenían algún trasplante previo, y al menos 16 (23%) pacientes tenían linfoma de doble/triple golpe. Cuarenta y nueve (49) sujetos de la cohorte principal fueron evaluados en este punto temporal en 6.A.2.

B. Seguridad:

[0714] Se evaluó la presencia o ausencia de acontecimientos adversos emergentes del tratamiento (TEAE) tras la administración de la terapia celular CAR-T. También se evaluó y controló la neurotoxicidad de los sujetos (complicaciones neurológicas que incluyen síntomas de confusión, afasia, encefalopatía, ataques mioclónicos, convulsiones, letargo y/o alteración del estado mental), calificada en una escala de 1 a 5, según la escala de Criterios Comunes de Toxicidad (CTCAE) del Instituto Nacional del Cáncer, versión 4.03 (NCI-CTCAE v4.03). Escala de Criterios Comunes de Toxicidad (CTCAE), versión 4.03 (NCI-CTCAE v4.03). Véase la Terminología común para los efectos adversos (CTCAE), versión 4, EE.UU. Departamento de Salud y Servicios Humanos, Publicado: 28 de mayo de 2009 (v4.03: 14 de junio de 2010); y Guido Cavaletti & Paola Marmioli). También se determinó y controló el síndrome de liberación de citoquinas (CRS), graduado en función de su gravedad. Véase Lee et al, Blood. 2014;124(2):188-95.

Ejemplo 6.B.1

[0715] El Ejemplo 6.B.1 describe los resultados basados en el punto de tiempo de análisis del Ejemplo 6.B.1.

[0716] En el 84% de los sujetos de la cohorte completa en el análisis del Ejemplo 6.B.1, no se observó síndrome de liberación de citoquinas (CRS) grave (grado 3 o superior) ni neurotoxicidad grave. Además, se observó que el 60% de los sujetos de la cohorte completa no desarrollaron ningún grado de CRS o neurotoxicidad. No se observaron diferencias en la incidencia de CRS, neurotoxicidad (NT), sCRS o neurotoxicidad grave (sNT) entre los niveles de dosis. La **Tabla E5** resume la incidencia del síndrome de liberación de citoquinas (CRS) y los acontecimientos adversos de neurotoxicidad en pacientes 28 días después de recibir al menos una dosis de células CAR-T. Como se muestra en la **Tabla E5**, no se observaron sCRS (Grado 3-4) en ninguno de los sujetos que recibieron una dosis única de DL2 o una dosis doble de DL1. Se observó neurotoxicidad grave o CRS grave (grado 3-4) en el 16% (9/55) de la cohorte completa de sujetos y en el 18% (8/44) de los sujetos del subconjunto básico. El 11% (n=6) de los sujetos recibieron tocilizumab, el 24% (n=13) de los sujetos recibieron dexametasona. Entre los sujetos ECOG2 de la cohorte completa, las tasas observadas de CRS y neurotoxicidad fueron del 71% y el 29%, respectivamente.

Tabla E5. Evaluación de la Presencia o Ausencia de Eventos Adversos de CRS y Neurotoxicidad para el Ejemplo 6.B.1

	COMPLETO				NÚCLEO
	Todos los niveles de dosis	DL1S	DL2S	DL1D [†]	
Seguridad, N	55	30	19	6	44
sCRS o sNT, n (%)	9 (16)	6 (20)	2 (11)	1 (17)	8 (18)
CRS o NT, n (%)	22 (40)	12 (40)	7 (37)	3 (50)	15 (34)
CRS					
Grado 1-2, n (%)	18 (33)	10 (33)	5 (26)	3 (50)	12 (27)
Grado 3-4, n (%)	1 (2)	1 (3)	0	0	1 (2)
Neurotoxicidad					
Grado 1-2, n (%)	3 (6)	1 (3)	2 (11)	0	2 (5)
Grado 3-4, n (%)	9 (16)	6 (20)	2 (11)	1 (17)	8 (18)

[†]Incluye un paciente tratado con la pauta de 2 dosis de DL2 debido a un error de dosificación.

Ejemplo 6.B.2

[0717] El Ejemplo 6.B.2 describe la evaluación en el punto temporal del Ejemplo 6.B.2. Hasta este punto temporal, se recogieron datos de acontecimientos adversos (AA) desde la linfodepleción (LD) hasta 90 días después de la administración de células T que expresan CAR. En el segundo momento, se evaluó la seguridad de 69 sujetos de la cohorte de LDCBG (cohorte completa), 38 de los cuales habían recibido DL1 en dosis única, 25 habían recibido DL2 en dosis única y 6 habían recibido DL1 en dosis doble. Los TEAE más frecuentes distintos del CRS o la NT fueron neutropenia (41%, 28/69), fatiga (30%, 21/69), trombocitopenia (30%, 21/69) y anemia (26%, 18/69). Se observó un TEAE de grado 5 de daño alveolar difuso.

[0718] No se observó toxicidad infusional aguda, y la mayoría de los sujetos de la cohorte completa, el 64% (44/69), no presentaron CRS ni NT, lo que indica que la administración ambulatoria de células T que expresan CAR puede ser posible. Las tasas de toxicidades asociadas a las células T CAR, incluidas CRS y la NT, no difirieron entre los niveles de dosis. Se observó que el perfil de seguridad era similar en todas las cohortes y niveles de dosis. Entre los 25 sujetos de la cohorte completa (36%) que experimentaron algún grado de CRS o NT, 21 (30%) tuvieron CRS y 14 (20%) NT. Ningún sujeto presentó CRS de grado 3 y sólo uno (1%, 1/69) presentó CRS de grado 4 y precisó cuidados en la UCI; el otro 29% (20/69) presentó CRS de grado 1-2. Del 20% de sujetos con TN, el 6% (4/69) presentaban Grado 1-2 y el 14% (10/69) Grado 3-4; 2 (3%) presentaron convulsiones. No se observó CRS de grado 5 ni NT de grado 5. No se observaron incidencias de edema cerebral. Todos los episodios de CRS y NT se resolvieron excepto un caso de temblor de grado 1, que seguía en curso en el momento del análisis. La mediana del tiempo transcurrido hasta el inicio del primero CRS y la NT fue de 5 días (intervalo de 2 a 12) y 10 días (intervalo de 5 a 23), respectivamente. En las primeras 72 horas tras la infusión, no se observó NT en ningún sujeto, y sólo en el 10% (7/69) se observó CRS (todos de grado 1); la NT fue precedida de CRS en >70% de los sujetos. En total, trece (13) sujetos (19%) requirieron intervención para el CRS o la NT con tratamiento anticitocinas (tocilizumab sólo 1 (1%), dexametasona sola 6 (9%) o ambos 6 (9%)) y solo uno requirió apoyo vasopresor. Las dosis medias de tocilizumab y dexametasona fueron 1 y 6, respectivamente. La mediana de la duración del CRS y la TN fue de 5 y 11 días, respectivamente. El análisis de la cohorte principal (n=49) también mostró tasas similares de CRS y NT.

[0719] En esta evaluación, se observaron bajas incidencias e inicios tardíos de CRS y/o NT, a las dosis. apoyaron la viabilidad de la infusión ambulatoria, como con ingreso hospitalario al primer signo de fiebre o fiebre de duración superior a un determinado periodo de tiempo, en vista de la. En el momento de la evaluación en 6.B.2, cuatro sujetos habían sido tratados en régimen ambulatorio.

C. Resultados de la respuesta tras el tratamiento

[0720] Se realizó un seguimiento de la respuesta de los sujetos, incluida la evaluación de la carga tumoral 1, 3, 6, 7, 12, 18 y 24 meses después de la administración de las células T CAR+.

Ejemplo 6.C.1

[0721] El Ejemplo 6.C.1 describe los resultados basados en el punto de tiempo de análisis del Ejemplo 6.A.1 y 6.B.1.

[0722] Las tasas de respuesta figuran en la **Tabla E6**. Se observaron altas tasas de respuesta duradera en la cohorte de sujetos, que incluía sujetos muy pretratados o, con mal pronóstico y/o con enfermedad recidivante o refractaria. Para los sujetos de todas las dosis de la cohorte básica (n=44), la tasa de respuesta global observada (ORR) fue del 86% y la tasa de respuesta completa observada (CR) fue del 59%. A los tres meses, la tasa de respuesta global (ORR) de la cohorte principal fue del 66%; la tasa de CR a los tres meses fue del 50% entre la cohorte principal. En la cohorte principal, la RRO a los 3 meses fue del 58% (11/19) en el nivel de dosis 1 y del 78% en el nivel de dosis 2; la tasa de CR a los 3 meses fue del 42% (8/19) para el nivel de dosis 1 y del 56% (5/9) para el nivel de dosis 2, lo que concuerda con un efecto dosis-respuesta sugerido en el resultado del tratamiento. Además, los resultados fueron coherentes con una relación entre la dosis y la durabilidad de la respuesta.

Tabla E6. Respuesta								
	COMPLETA				NÚCLEO			
	Todos los niveles de dosis	DL1S	DL2S	DL1D ^c	Todos los niveles de dosis	DL1S	DL2S	DL1D ^c
Mayor respuesta total, N ^a	54	30	18	6	44	25	15	4
ORR, % (95% CI)	76 (62, 87)	80 (61, 92)	72 (47, 90)	67 (23, 96)	86 (73, 95)	84 (64, 95)	87 (60, 98)	100 (40, 100)
CR, % (95% CI)	52 (38, 66)	53 (34, 72)	50 (26, 74)	50 (12, 88)	59 (43, 74)	56 (35, 76)	60 (32, 84)	75 (19, 99)
≥ 3 meses (n)	41	24	11	6	32	19	9	4
n ^b								
3 meses ORR, % (95% CI)	51 (35, 67)	46 (26, 67)	64 (31, 89)	50 (12, 88)	66 (47, 81)	58 (34, 80)	78 (40, 97)	75 (19, 99)
3 meses CR, % (95% CI)	39 (24, 56)	33 (16, 55)	46 (17, 77)	50 (12, 88)	50 (32, 68)	42 (20, 67)	56 (21, 86)	75 (19, 99)

DL1S: DL1 esquema de 1 dosis; DL2S: DL2 esquema de 1 dosis; DL1D: DL1 Esquema de 2 dosis;

^aSe incluyeron pacientes con evento de EP, muerte o exploraciones de reestadificación a los 28 días. Pacientes tratados

^bNo se incluyeron los pacientes con menos de 28 días de antelación a la recogida de datos.

^c El denominador es el número de pacientes que recibieron la terapia con células T CAR ≥ 3 meses después de la fecha de la instantánea con una evaluación de la eficacia en el mes 3 o una evaluación previa de EP o muerte.

^d Incluye un paciente tratado con la pauta de 2 dosis DL2 debido a un error de dosificación.

[0723] Entre los sujetos tratados seis meses o más antes del momento concreto de la evaluación, de los diez (10) pacientes que habían respondido a los tres meses, nueve (90%) seguían respondiendo a los seis meses. En el momento de la evaluación, el 97% de los sujetos del subconjunto básico que habían respondido estaban vivos y en seguimiento, con una mediana de tiempo de seguimiento de 3,2 meses. Se observó una supervivencia prolongada en los pacientes que respondieron, con una mayor durabilidad de la respuesta en los sujetos con CR. Todos los pacientes en respuesta a

los tres meses seguían vivos en el momento de la evaluación, aunque 5/6 sujetos con mal estado funcional (ECOG 2) habían fallecido.

Ejemplo 6.C.2

[0724] El Ejemplo 6.C.2 describe los resultados basados en el punto de tiempo de análisis del Ejemplo 6.A.2 y 6.B.2.

[0725] Hasta el punto temporal del Ejemplo 6.C.2, se evaluó la respuesta de 68 sujetos de la cohorte completa de LDCBG. Las tasas de respuesta global u objetiva (OR) y de respuesta objetiva a los 3 y 6 meses fueron del 75% (51/68), 49% (27/55) y 40% (14/35), respectivamente. La tasa de respuesta completa (CR), la tasa de CR a los 3 meses y la tasa de CR a los 6 meses fueron del 56% (38/68), 40% (22/55) y 37% (13/35), respectivamente. Se observó una tendencia hacia una mejor tasa de respuesta a los 3 meses en los sujetos tratados en DL2 en comparación con DL1: 63% (12/19; IC 95% 38, 84) frente a 40% (12/30; IC 95% 23, 59) para ORR con $p=0,148$, y 58% (11/19; IC 95% 34, 80) frente a 27% (8/30; IC 95% 12, 46) para CR con $p=0,0385$. Entre los 16 sujetos con linfoma de doble/triple impacto, la ORR fue del 81% y la tasa de CR a los 3 meses fue del 60%.

[0726] En la cohorte principal ($n=49$ para el punto temporal del Ejemplo 1.C.2), las tasas de OR, OR a 3 meses y OR a 6 meses fueron del 84% (41/49), 65% (26/40) y 57% (13/23), respectivamente. La tasa de CR, la tasa de CR a los 3 meses y la tasa de CR a los 6 meses fueron del 61% (30/49), 53% (21/40) y 52% (12/23), respectivamente. Se observó una tendencia similar en la mejora de la ORR duradera y la CR a los 3 meses con dosis más altas. En concreto, para los pacientes de la cohorte CORE a los que se administró DL2, la ORR a los 3 meses fue del 80% (12/15; IC del 95%: 52, 96) y la CR a los 3 meses fue del 73% (11/15; IC del 95%: 45, 92), en comparación con las tasas de ORR y CR a los 3 meses del 52% (11/21; IC del 95%: 30, 74) y del 33% (7/21; IC del 95%: 15, 57) en los sujetos de la cohorte CORE a los que se administró DL1, con $p=0,159$ y $p=0,0409$ respectivamente. Entre los sujetos de la cohorte CORE que habían recibido DL2 y con un seguimiento de 3 meses ($n=15$), la ORR a 3 meses fue del 80% y la CR a 3 meses fue del 73%.

[0727] La mediana de DOR en la cohorte completa y en las cohortes principales en este punto temporal en 1.C.2 fue de 5,0 y 9,2 meses, respectivamente; la mediana de duración de la CR fue de 9,2 meses en la cohorte completa. La mediana de la duración de la CR no se había alcanzado en la cohorte principal. La mediana de la supervivencia global (SG) fue de 13,7 meses en la cohorte completa y no se había alcanzado en la cohorte principal. La SG a 6 meses fue del 75% en la cohorte completa, con una mediana de seguimiento de 5,8 meses. La SG a 6 meses fue del 88% en la cohorte principal, con una mediana de seguimiento de 5,6 meses.

D. Evaluación de CAR⁺ en sangre

[0728] Basándose en los datos del punto temporal descrito en el Ejemplo 6.A.1, 6.B.1 y 6.C.1, se realizó un análisis farmacocinético para evaluar los números de células T CAR⁺ en sangre periférica en varios puntos temporales post-tratamiento. Se analizaron los resultados de los cincuenta y cinco (55) sujetos evaluados en el punto temporal del Ejemplo 6.A.1 en la cohorte de DLBCL y cuatro (4) sujetos (evaluados en ese mismo punto temporal) en la cohorte de linfoma de células del manto (MCL), tal como se describe en el Ejemplo 7 a continuación. Las mediciones farmacocinéticas (PK) se llevaron a cabo mediante citometría de flujo validada para detectar un marcador expresado en la construcción CAR y ensayos cuantitativos basados en PCR para detectar la integración de la construcción CAR. La aplasia de células B se evaluó mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos anti-CD19. Las células CD4⁺ y CD8⁺ que expresan CAR, medidas por el número de células/ μ L de sangre (mediana $\pm$ cuartiles) trazadas en una escala logarítmica, se detectaron durante todo el curso de la evaluación en ambos niveles de dosis administradas. Los sujetos que recibieron DL2 en comparación con DL1 presentaron una mediana de C_{max} y de AUC_{0-28} más elevada para los subconjuntos de células T CD3⁺/CAR⁺, CD4⁺/CAR⁺, y CD8⁺/CAR⁺ en sangre periférica (AUC_{0-28} : DL2 vs. DL1 fue 1836 vs. 461, 350 vs. 182) y 1628% (0,10 vs. 114, para CD3⁺, CD4⁺, y CD8⁺, respectivamente; $p < 0,05$ para CD8⁺; C_{max} : DL2 vs. DL1 fue de 99,8 frente a 27,9, 15,1 vs. 5,2, y 73.1 vs. 5,5 células/ μ L, respectivamente). La mediana del tiempo transcurrido hasta la máxima expansión de células T CD3⁺ CAR⁺ fue de 15 días (intervalo 8-29) y no difirió entre los niveles de dosis. Las células T CD4⁺ y CD8⁺ que expresan CAR se dirigieron a la médula ósea en niveles relativamente similares.

[0729] Se observó un aumento de la mediana del área bajo la curva (AUC) (número de células T CAR⁺ CD8⁺ a lo largo del tiempo en la sangre) entre los sujetos a los que se administró el nivel de dosis más alto, en comparación con el nivel de dosis más bajo, sin que se observara un aumento de la toxicidad. Se observó una mayor exposición máxima de células T CD8⁺/CAR⁺ en los respondedores (CR/PR) que en los no respondedores (EP); la persistencia de las células a lo largo del tiempo de evaluación, incluso hasta los 3 y 6 meses, se observó incluso en sujetos cuya enfermedad había progresado. La mediana de la C_{max} y la mediana de la AUC_{0-28} de las células T CAR⁺ CD8⁺ fueron mayores en los sujetos respondedores y con respuesta duradera en el mes 3 (mediana de la C_{max} de CD8⁺ = 20,8 frente a la mediana de AUC_{0-28} 5,5; mediana AUC_{0-28} CD8⁺ = 235 frente a mediana AUC_{0-28} CD8⁺ = 235 frente a mediana AUC_{0-28} CD8⁺ = 235. 55 en CR/PR en el mes 3 frente a EP en el mes 3). Entre los sujetos a los que se evaluó la persistencia de células T CAR, el 90% y el 93% de 29 sujetos tenían células T CD8⁺ y CD4⁺ CAR⁺ detectables, respectivamente, en el tercer mes; el 63% y el 58% de 19 sujetos tenían células T CD8⁺ y CD4⁺ CAR⁺ detectables, respectivamente, en el sexto mes. En los meses 3 y 6, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la persistencia de las células T CAR⁺ entre los sujetos con respuesta duradera o recaída. Las células T CAR⁺ fueron detectables en el momento de la recaída en el 89% de los 11 sujetos con FC, a pesar de que se demostró aplasia de células B (<1 célula/ μ L) en casi todos los sujetos 97% (34/35).

en el mes 3, y 100% (24/24) en el mes 6.

[0730] No se observó que una mayor C_{max} y AUC_{0-28} en DL2 en comparación con DL1 estuviera asociada con una mayor SIR o NT. Para cualquier NT o para CRS > Grado 2, las AUC medianas de células T CD4⁺/CAR⁺ y CD8⁺/CAR⁺ fueron de 5 a 10 veces y de 3 a 5 veces mayores, respectivamente, que la AUC mediana para DL2. Se observó que una mayor carga de enfermedad y niveles basales de citocinas inflamatorias se asociaban con mayores niveles máximos de células T CAR⁺, mayores niveles máximos de citocinas y mayor incidencia de CRS y NT. Los resultados fueron coherentes con la conclusión de que la mayor C_{max} y la mediana de AUC_{0-28} en DL2 no aumentaron el CRS ni la NT.

Ejemplo 7: Administración de células CAR anti-CD19 a sujetos con linfoma de células del manto (MCL)

[0731] Composiciones terapéuticas de células T CAR⁺ que contienen células T autólogas que expresan un antígeno-receptor quimérico (CAR) específico para CD19, generadas como se describe en el Ejemplo 1, se administraron a cuatro (4) sujetos humanos con linfoma de células del manto (MCL) que habían fracasado en 1 línea de terapia. Las composiciones celulares criopreservadas se descongelaron antes de su administración intravenosa. La composición de células T terapéuticas se administró como un producto celular de composición definida con poblaciones formuladas CD4⁺ y CD8⁺ de células T de ingeniería CAR⁺ derivadas del mismo sujeto administradas a una proporción objetivo de aproximadamente 1: 1. Se administró a los sujetos una dosis de células T que expresan CAR (como dosis dividida de las células T que expresan CAR CD4⁺ y CD8⁺) en una dosis única de nivel de dosis 1 (DL1) que contenía 5×10^7 células T que expresan CAR. Comenzando tres (3) días antes de la infusión de células T CAR⁺, los sujetos recibieron una quimioterapia de linfodepleción con flurabina (flu, 30 mg/m²) y ciclofosfamida (Cy, 300 mg/m²).

[0732] Se controló la respuesta y las toxicidades de los sujetos como se describe en el Ejemplo 1. No se observó CRS ni neurotoxicidad en ninguno de los sujetos. De los 4 sujetos que fueron tratados, dos (2) sujetos lograron RP (no duradero) y dos (2) pacientes tuvieron enfermedad progresiva.

Ejemplo 8: Atributos de la composición terapéutica de células T para administración y proceso de generación de la composición

[0733] Las composiciones de células T terapéuticas ejemplares que contienen células T autólogas que expresan un antígeno-receptor quimérico (CAR) específico para CD19, utilizadas para la administración en el Ejemplo 2 anterior, se evaluaron para más de cien atributos fenotípicos, funcionales y relacionados con la salud celular, utilizando citometría de flujo y ensayos in vitro. Se examinaron las composiciones celulares terapéuticas de sujetos inscritos en un estudio clínico que evaluaba la terapia celular CAR-T anti-CD19 para el tratamiento del linfoma no Hodgkin de células B recidivante/refractario (N=63; cohorte central). Se evaluaron los atributos de las células antes y después de la ingeniería. Los atributos que se evaluaron incluyen los descritos en el Ejemplo 1, y en la **Tabla E7** se exponen atributos evaluados ejemplares. Mediante citometría de flujo se examinaron los marcadores fenotípicos asociados a la salud y la memoria celular, así como otros fenotipos de los productos celulares. La funcionalidad de las células T se evaluó mediante bioensayos in vitro con antígenos específicos. Se realizaron pruebas de caracterización y liberación en muestras de las composiciones de células T terapéuticas formuladas que habían sido sometidas a un número representativo de ciclos de congelación-descongelación correspondientes a los de las composiciones de células administradas.

Tabla E7: Atributos de caracterización representativos medidos en las composiciones celulares terapéuticas que contienen células T anti-CD19 CAR	
Clase de caracterización de composición	Atributo representativo
celular	
Salud celular	Viabilidad
	Caspasa 3 intracelular activa
	Anexina V
Fenotipo de memoria	CCR7 (receptor de quimiocina C-C tipo 7)
Función celular	Citoquinas inflamatorias tal como TNF- α (factor de necrosis tumoral α)

[0734] Para la generación de composiciones celulares para administración, se aislaron células autólogas de los sujetos mediante leucaféresis. Las muestras de leucaféresis se sometieron a un proceso de generación de células con expresión CAR. El proceso implicó el lavado de las células mediante un lavado automatizado y la selección basada en inmunoafinidad para la purificación de células T CD4⁺ y CD8⁺, lo que dio como resultado dos composiciones, enriquecidas para células CD8⁺ (en las que una mediana del 99%, intervalo intercuartílico [IQR] 98-100%, de las células eran CD8⁺) y CD4⁺ (en las que una mediana del 99%, IQR 99-100%, de las células eran CD4⁺), respectivamente.

[0735] Como se muestra en la FIG. 24 y resumida en la **Tabla E8**, la purificación automatizada de células T dio como resultado la pureza indicada de las poblaciones de células T CD8+ y CD4+. En algunas realizaciones, tales aspectos de purificación pueden reducir la probabilidad de transducir células no T en los pasos de transducción del proceso y/o dar lugar a elevadas purezas de células T en la composición celular terapéutica, de una manera que es independiente de la duración de la expansión u otros aspectos de la expansión o incubación con reactivos específicos de células T.

Tabla E8: Pureza de células T (% de leucocitos totales) por el paso de proceso					
		Leucaféresis	Pos-Purificación	Proceso medio	Composición de fármaco
Frecuencia de células T CD4+	Media	17.6	95.3	98.9	99.2
	IQR	11.7-24.7	92.1-98.5	98.1-99.2	98.7-99.6
Frecuencia de células T CD8+	Media	19.2	96.0	98.9	99.3
	IQR	13.2-30.9	93.4-98.6	98.0-99.2	98.4-99.7

[0736] Las células de las composiciones CD4+ y CD8+ enriquecidas se sometieron por separado a transducción lentiviral con un vector que codifica un CAR anti-CD19 con un dominio costimulador 41BB. A continuación, las poblaciones transducidas se incubaron por separado en presencia de reactivos estimulantes para la expansión celular. Las células CD8+ y CD4+ expandidas se formularon y crioconservaron por separado y se almacenaron antes de su administración. Para minimizar las variaciones, entre lotes y/o composiciones celulares derivadas de diferentes pacientes, como las que tienen diferentes atributos de paciente, en parámetros indicativos de la salud celular, las células se mantuvieron a volúmenes constantes en todos los lotes. Los productos celulares presentaban un intervalo ajustado de concentraciones de células viables (según una evaluación de las composiciones celulares de un grupo de sujetos, CD8+: mediana 31×10^6 células/mL, IQR $28-40 \times 10^6$ células/mL, N=38; CD4+: mediana 35×10^6 células/mL, IQR $31-40 \times 10^6$ células/mL, N=36).

[0737] En el lugar de administración, las células fueron descongeladas y administradas, según un volumen objetivo de cada composición correspondiente al número de células CD8+CAR+ y CD4+CAR+ en la dosis apropiada (como para DL1 o DL2). Para minimizar las variaciones en la salud celular entre lotes, para la formulación, la criopreservación y el almacenamiento se mantuvieron a un volumen constante, con un intervalo ajustado de concentraciones celulares viables (CD8+: mediana 31×10^6 células/mL, IQR $28-40 \times 10^6$ células/mL, N=38; CD4+: mediana 35×10^6 células/mL, IQR $31-40 \times 10^6$ células/mL, N=36).

[0738] Durante el ensayo clínico hubo un cambio de proceso de una formulación de alto volumen a una de bajo volumen. La composición de células terapéuticas tras el cambio se formuló a un volumen bajo constante, con una gama de concentraciones de células viables estrictamente controlada. En algunos casos, se utilizó una formulación de bajo volumen en lugar de una de alto volumen. Se evaluaron parámetros indicativos de la salud de las células T que expresan CAR en las composiciones para administración, como por ejemplo midiendo, tras la descongelación, la viabilidad, la expresión de Anexina V en la superficie celular y los niveles de Caspasa 3 intracelular activa. Se compararon las composiciones celulares que se formularon con un volumen alto y las que se formularon con un volumen bajo.

[0739] El cambio de proceso de la formulación de alto volumen a la formulación de bajo volumen resultó en una mayor robustez del proceso y una menor variabilidad de los atributos de salud celular. Los valores de concentración, porcentaje de células viables y porcentaje de células caspasa-3 negativas activas entre las células T CD4+ y CD8+ procedentes de composiciones celulares individuales se muestran en la FIG. 25 y se resumen en la **Tabla E9**. La mediana del porcentaje de células que expresaban Anexina V fue del 11% (IQR 9-18%; N=33) de las células T CD8+CAR+ y del 10% (IQR 8-17%; N=31) de las células T CD4+CAR+. Se observó que la expresión de la caspasa 3 era similar a la expresión de la anexina V. El cambio a la formulación de bajo volumen aumentó la robustez del proceso y redujo la varianza de los atributos de salud celular.

Tabla E9: Atributos de la salud celular					
		CD4+		CD8+	
		Volumen de formulación alta	Volumen de formulación baja	Volumen de formulación alta	Volumen de formulación baja
Concentración de células $\times 10^6$ células/mL	Media	17.1	37.2	12.1	30.8
	IQR	15.9-19.3	31.7-40.4	10.9-15.3	28.5-38.0
% de viabilidad celular	Media	82.8	82.5	72.0	80.3
	IQR	79.5-84.7	80.4-84.3	69.3-76.6	76.4-83.3
% de células negativas de caspasa-3	Media		82.8		82.5
	IQR		79.5-84.7		80.4-84.3

Las cantidades de células T CAR+CD4+ y CAR+CD8+ en la composición para la administración se controlaron con precisión. Se observó que el número de células realmente administradas a un conjunto ejemplar de sujetos estaba dentro del 8 % o menos del número objetivo de células para una dosis dada: $2,4-2,7 \times 10^7$ (objetivo $\pm 8\%$) células T CD4+CAR+ y $2,4-2,7 \times 10^7$ (objetivo $\pm 8\%$) células T CD8+CAR+ para los sujetos a los que se administraron células en DL1 (n=48)

$4,6-5,1 \times 10^7$ (objetivo $\pm 8\%$) células T CD4+CAR+ o $4,6-5,1 \times 10^7$ (objetivo $\pm 8\%$) células T CD8+CAR+ para los sujetos a los que se administraron células en DL2 (n=20).

[0740] Se encontró que el intervalo de dosis administrada tenía baja variabilidad en un conjunto ejemplar diferente de sujetos:

48-52 $\times 10^6$ células CD3+CAR+T en DL1 (n =34)
 96-101 $\times 10^6$ células CD3+CAR+T en DL2 (n = 29)
 24-27 $\times 10^6$ células T CD4+CAR+ o CD8+CAR+ en DL1 (n = 34)
 46-51 $\times 10^6$ células T CD4+CAR+ o CD8+CAR+ en DL2 (n = 29)

[0741] Como se muestra en la FIG. 26, se observó que las composiciones de células T con expresión de CAR administradas a los sujetos presentaban una elevada pureza de células T y una baja varianza entre lotes. Los controles del proceso y del producto dieron como resultado composiciones celulares terapéuticas que contenían células T CAR con una baja variabilidad de lote a lote en la función celular específica de las células T.

[0742] La acumulación de citocinas específicas de antígeno *in vitro* y la tinción intracelular de citocinas (ICS) mostraron una varianza baja similar entre lotes para la producción de citocinas para múltiples citocinas (IL-2, TNF- α e IFN- γ). En un experimento ICS ejemplar, las células de las composiciones se estimularon con CD19, se tiñeron para citoquinas, incluyendo TNF- α , y proteínas de superficie, incluyendo el receptor de quimioquinas C-C tipo 7 (CCR7) como marcador de fenotipo de memoria, y se analizaron por citometría de flujo. Se determinó el número de células en la composición para la administración que eran positivas para las citocinas o las proteínas de superficie. La FIG. 27 muestra el número de células CD4+CAR+ y CD8+CAR+, células CD4+CAR+TNF- α + y CD8+CAR+TNF- α +, células CD4+CAR+CCR7+ y CD8+CAR+CCR7+ y presentes en las composiciones de células T CAR para su administración en DL1 y DL2. Estos resultados se resumen en la Tabla E10. Los resultados muestran una baja variabilidad en el número de células CD4+CAR+ y CD8+CAR+, células CD4+CAR+TNF- α + y CD8+CAR+TNF- α +, células CD4+CAR+CCR7+ y CD8+CAR+CCR7+. Por ejemplo, se observó un intervalo estrecho para el número de células positivas para la producción de TNF- α (n = 61).

Tabla E10: Dosis controlada, fenotipos de células T, y función específica de células
(x 10⁶ células)

	CD4 ⁺ CAR ⁺		CD8 ⁺ CAR ⁺		CD4 ⁺ C AR ⁺ TNF-α ⁺		CD8 ⁺ CAR ⁺ TNF-α ⁺		CD4 ⁺ CAR ⁺ CCR7 ⁺		CD8 ⁺ CAR ⁺ CCR7 ⁺	
	DL1	DL2	DL1	DL2	D L1	D L2	DL1	DL2	DL1	DL2	DL1	DL2
Media	25.1	50.1	25.0	50.0	23 .0	47 .4	199	41.7	11.1	15.8	8.9	15.0
IOR	24.7 ~ 25.3	49.6 ~ 50.0	24.8 ~ 25.2	49.6 50.4	21 3 23 5	46 6 48 5	183 21.8	39.9 46.0	5.5 14.1	11.0 26.0	3.0 14.8	8.6-25.3

[0743] Un parámetro indicativo de la producción por las células CAR⁺ del factor de necrosis tumoral alfa (TNFα) tras la estimulación con CD19 mostró un estrecho intervalo entre los diferentes lotes, con una desviación estándar relativa (RSD) del 37% para las células T CD4⁺CAR⁺ (N=59) y del 51% para las células T CD8⁺CAR⁺ (N=61).

[0744] Los resultados fueron coherentes con la observación de que una composición que contiene una dosis precisa y constante de células T CAR CD4⁺ y CD8⁺, el control y la optimización de las condiciones de cultivo de células T CD4⁺ y CD8⁺, la baja variabilidad de la producción de citoquinas y/o la formulación y el volumen constantes de la composición para la administración pueden conducir a una salud celular constante en la composición. En las realizaciones proporcionadas, los aspectos de dicho proceso de fabricación y control contribuyen a una baja variabilidad en los atributos de dichas composiciones celulares diseñadas utilizando células procedentes de, y generadas para su administración a, un número de sujetos diferentes. Tales aspectos en algunos aspectos incluyen el uso de una dosis plana precisa y consistente de células CD4⁺ y CD8⁺ administradas entre sujetos; control y optimización de las condiciones de cultivo de células T CD4⁺ y CD8⁺ tales como las que resultan en una baja variabilidad entre lotes de producto farmacológico de fenotipos (por ejemplo, CCR7) y función in vitro (por ejemplo, IL-2, TNF-α y producción de IFN-γ y tras la estimulación con antígenos), por ejemplo entre diferentes sujetos; y el uso de una formulación y un volumen constantes del producto farmacológico, que puede dar lugar o contribuir a la coherencia entre las composiciones celulares terapéuticas generadas por el método en atributos indicativos de la salud celular.

Ejemplo 9: Factores basales adicionales asociados al desarrollo de neurotoxicidad tras la terapia con células T CAR

[0745] Varios factores basales, medidos antes del tratamiento con composiciones de células CAR-T en varios estudios clínicos diferentes para neoplasias de células B como ALL y LNH, fueron evaluados y comparados entre sujetos que tenían y que no habían desarrollado neurotoxicidad de grado 3 o superior. Se analizaron los datos de 3 ensayos clínicos (incluido el estudio descrito en el Ejemplo 1 que incluía el tratamiento con CAR-T anti-CD19 en sujetos con ALL (Ensayo 1), el estudio clínico descrito en el Ejemplo 2 que incluía un tratamiento similar con CAR anti-CD19 administrado a sujetos con ALL en recaída o refractaria en adultos (Ensayo 2), y un ensayo clínico adicional en el que sujetos con neoplasias de células B, incluida la ALL y el linfoma no Hodgkin (LNH), fueron tratados con células que expresaban un CAR anti-CD19 diferente (Ensayo 3)). A los sujetos se les administraron composiciones de células CAR-T anti-CD19 y se les controló la respuesta clínica y los resultados adversos. La neurotoxicidad se calificó en una escala de 0-5 como se describe en el Ejemplo 1.

[0746] Los factores basales se analizaron, a posteriori, y se compararon entre los sujetos mediante una serie de análisis estadísticos. En las Tablas E11-A y E11-B siguientes se enumeran factores basales ejemplares que se observó que estaban asociados con neurotoxicidad de grado 3 o mayor en los sujetos, incluidos los niveles de IL-15 sérica y recuentos de células plaquetarias antes de la administración de células CAR-T, tipo de enfermedad (linfoma no Hodgkin [LNH] en comparación con ALL) y carga de la enfermedad definida por porcentajes de blastos en la médula ósea. Las firmas de expresión génica también se encontraban entre los parámetros identificados: los sujetos positivos para el cromosoma Filadelfia (Ph⁺) o que tenían un perfil de expresión génica parecido al perfil de expresión génica Ph⁺ (similar a Ph), tuvieron significativamente menos casos de neurotoxicidad de grado 3 o superior que los sujetos que no lo tenían (no Ph). En la Tabla E11-A se muestran factores basales ejemplares asociados con neurotoxicidad de grado 3 o superior en el Ensayo 1. En la Tabla E11-B se muestran factores basales ejemplares asociados con neurotoxicidad de grado 3 o superior en los

tres ensayos clínicos.

Tabla E11-A: Parámetros basales ejemplares asociados con neurotoxicidad de grado 3 o superior en el ensayo

1

5

Factor de valor de referencia	Indicación	Criterio	Gr $\geq$ 3 NTX	Valor p ^a
Marcador inflamatorio: IL-15 en plasma	Afecciones malignas de células B	IL-15 ^b alta	10/11 (91%)	.01
		IL-15 alta	10/24(42%)	
Firma de la expresión génica	ALL	no Ph	12/15 (80%) Grado 4 o 5: 7 eventos	.03
		similar a Ph+/Ph-	6/16 (38%) Grado 4 o 5: 0 eventos	

Tabla E11-B: Parámetros de valor de referencia ejemplares asociados con neurotoxicidad Grado 3 o más alto

Factor de valor de referencia	Indicación	Criterio	Gr ≥ 3 NTX	Valor p ^a	Fuente
Marcador inflamatorio: IL-15 en suero	Afecciones malignas de células B	IL-15 ^b alta	26/45 (58%)	< .0001	Ensayo 1
		IL-15 baja	19/109 (17%)		Ensayo 3
Cuento de plaquetas	TODAS	<120 K	60/162 (37%)	.002	Ensayo 1
		>120 K	9/60 (15%)		Ensayo 2 Ensayo 3
Tipo de enfermedad	Afecciones malignas de células B	ALL	14/47 (30%)	.003	Ensayo 3
		NHL	8/62 (13%)		
Carga de enfermedad	TODAS	≥5% de blastos BM	40/94 (43%)	.02	Ensayo 1
		< 5% de blastos BM	9/42 (21%)		Ensayo 2 Ensayo 3
Firma de la expresión génica	TODAS	lo Ph	12/15 (80%) Grado 5: 5 eventos	.03	Ensayo 1
		similar a Ph+/Ph-	6/16 (38%) Grado 5: ninguno		

^aPrueba exacta de Fisher de dos lados.

^bIL-15 alta ≥ 30 pg/mL.

[0747] Las muestras de sangre recogidas de los sujetos en varios puntos temporales después de la administración de células CAR-T en el Ensayo 1 se analizaron para los recuentos de células CAR+-T. Se evaluaron los niveles séricos de citocinas (por ejemplo, IL-15) de los sujetos antes del tratamiento (cribado) y en varios momentos después del tratamiento (día 2, día 4 y día 7). Los resultados demostraron que la neurotoxicidad prolongada y mortal se correlacionaba con un aumento temprano y rápido de los niveles de IL-15, una citocina promotora de las células T, y con la expansión de las células T CAR.

[0748] Como se discutió en el Ejemplo 1, se observó una expansión más rápida de células CAR-T y una expansión pico más temprana de células T que expresan CAR en la sangre de sujetos que desarrollaron neurotoxicidad más severa, y en particular aquellos que desarrollaron neurotoxicidad de grado 5 y edema cerebral. Por ejemplo, los resultados indicaron que estos sujetos habían mostrado un nivel detectable de células CAR+ por µl de sangre en los 4-7 días siguientes a la primera dosis de células, observándose más de 20 células CAR+ por µl de sangre en la sangre de todos estos sujetos en los siete días siguientes a la administración de las células (véanse las FIGs. 1 y 2). En los sujetos con neurotoxicidad menos grave, la expansión máxima de células T CAR+ se observó generalmente más tarde y con un número máximo inferior de células T CAR+ por microlitro (FIGs. 2, 28).

[0749] Entre las citocinas cuyos niveles medianos alcanzaron un pico varias veces por encima de los niveles basales tras la infusión de células CAR-T se encontraban la IL-2 (14 veces), la IL-6 (2,7 veces), la IL-10 (3,5 veces), la IL-15 (2,5 veces) y el IFN-gamma (3,3 veces). En el grupo de sujetos que habían experimentado antes el pico de expansión de células CAR-T (número máximo de CAR+-T en el día 7), se observaron niveles séricos medios de IL-15 más altos y un aumento

más pronunciado en el suero hasta el día 4 tras la administración, en comparación con los sujetos con un pico de expansión de células CAR-T más tardío (FIG. 28). En el siguiente punto temporal (día 7) en el que se midieron los niveles séricos de IL-15, los niveles séricos de IL-15 en estos sujetos con expansión máxima rápida habían disminuido y eran aproximadamente comparables o inferiores a los niveles de los sujetos con expansión máxima más tardía. Los resultados fueron coherentes con la conclusión de que los niveles séricos basales de IL-15 y/o los aumentos más altos o rápidos de los niveles de IL-15, pueden indicar o correlacionarse con el riesgo potencial de neurotoxicidad o edema cerebral o la gravedad de los mismos, tras el tratamiento con células CAR-T. También se ha observado que las quimioterapias linfodepletoras y de puente se asocian a un aumento de las citocinas promotoras de la proliferación de células T, como la IL-15.

[0750] La presente invención no pretende limitarse en su alcance a las realizaciones particulares divulgadas, que se proporcionan, por ejemplo, para ilustrar diversos aspectos de la invención. Varias modificaciones de las composiciones y métodos descritos resultarán evidentes a partir de la descripción y las enseñanzas del presente documento.

SECUENCIAS

[0751]

SEQ ID NO.	SECUENCIA	DESCRIPCION
1	ESKYGPPCPPCP	espaciador (IgG4bisagra) (aa) Homo sapiens
2	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCTTGCCCT	espaciador (IgG4bisagra) (nt) homo sapiens
3	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNYTOKSLSLSLGK	Espaciador de Bisagra-CH3 Homo sapiens
4	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVOFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLTQDHLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV	Espaciador de Bisagra-CH2-CH3 Homo sapiens

	EWESNGOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	
5	RWPESPKAQASSVPTAQPOAEGSLAKATTAPATTRNTGRG GEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTOPLGVYLLTPAVQ DLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEG LLERHSNGSOSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPP ORLMALREPAAOAPVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSG FSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPOPGSTTFWAWS VLRVPAPPSPOPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSYVTD H	IgD-bisagra-Fc Homo sapiens
6	LEGGGEGRGSLTTCGDVEENPGPR	T2A artificial
7	RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSSIGDLHILPVAFR GDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLIQAWPENRTDLHA FENLEIIRGRTKQHGOFS LAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVII SGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGO VCHALCSPEGOWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLE GEPREFVENSECQCHPECLPOAMNITCTGRGPDNCIQCA HYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHP NCTYGCTGPGLEGCP TNGPKIPSIATGMV GALLLLLVALGI GLFM	EGFR artificial
8	FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (aminoácidos 153-179 del No. de Acceso P10747) Homo sapiens
9	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLPGPSKPFWV LVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (aminoácidos 114-179 del No. de Acceso P10747) Homo sapiens
10	RSKRSPLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAA ÑOS	CD28 (aminoácidos 180-220 de P10747) Homo sapiens

11	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHVQPYAPPRDFAAA ÑOS	CD28 (LL a GG) Homo sapiens
12	KRGRIKLLYIFKQPFMRPVOTTOEEDGCSCRFPEEEEEGGC EL	4-1BB (aminoácidos 214-255 de Q07011.1) Homo sapiens
13	RVKFSRSADAPAYQGGONQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRIKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGHDGLYOGGLSTATKDTYDALHMOALPPR	CD3 zeta Homo sapiens
14	RVKFSRSAEPPAYQGGONQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRIKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGHDGLYOGGLSTATKDTYDALHMOALPPR	CD3 zeta Homo sapiens
15	RVKFSRSADAPAYKGGONQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRIKNPQEGLYN ELOKDKMAEA YSEIGMKGER RRGKGHDGLY OGLSTATKDTYDALHMOALP PR	CD3 zeta Homo sapiens
16	PGGG (SGGGG) ₅ -P.	ligador
17	GSADDAKKDAKKDGKS	ligador
18	EGRGSLTCCGDVEENPGP	T2A
19	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
20	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
21	OCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
22	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A
23	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIIPRKVCNGIGIGEFKOSLSINATN IKHFKNCTSIGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTV KEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAV VSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNLCYANTINWKKLFGT SGGKTKIISNRGENSCKATGOVCHALCSPEGOWGPEPRDC VSCRFNVSRGRECVDKONLLEGEPRFVENSECIOCHPECL PQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCAPAGVMGEN NTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGGTGPGLGCGPTNGPKI PSIATGMVIGALLLLLVVALGIGLFM	EGFR artificial
24	atgctctctcgggacaaagcctctgctctgaggtaccacaaccagcatctctgag caca	Secuencia señal de cadena alfa GMCSFR
25	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIIP	Secuencia señal de

		cadena alfa GMCSFR
26	MALPVTALLPLALLHA	Péptido señal alfa CD8
27	EPKSCDKTHTCPPCP	Bisagra
28	ERKCCVECPPCP	Bisagra
29	ELKTPPLGDTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPP PCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP	Bisagra
30	ESKYGFPCPSCP	Bisagra
31	X ₁ PPX ₂ P X ₁ es glicina, cisteína o arginina X ₂ es cisteína o treonina	Bisagra
32	Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Bisagra
33	Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Bisagra
34	Glu Val Val Val Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Bisagra
35	RASQDISKYLN	FMC63 CDR L1
36	SRLHSGV	FMC63 CDR L2
37	GNTLPYTFG	FMC63 CDR L3
38	DYGV	FMC63 CDR H1
39	VMGSETTYNSALKS	FMC63 CDR H2
40	YAMDYWG	FMC63 CDR H3
41	EVKLOESGPGLVAPSSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRP PRKGLEWLGVMGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSKQVFLK MNSLOTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSS	FMC63 VH
42	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPD GTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDI ATYFCQQGNTLPYTFGGGTGLEIT	FMC63 VL
43	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPD GTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDI ATYFCQQGNTLPYTFGGGTGLEITGSTSGSGKPGSGEGST KGEVKLOESGPGLVAPSSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIR QPPRKGLEWLGVMGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSKQVFL KMNSLOTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVS S	FMC63 scFv
44	KASQNVGTINVA	SJ25C1 CDR L1
45	SATYRNS	SJ25C1 CDR L2
46	QQYNRYPT	SJ25C1 CDR L3
47	SYWMN	SJ25C1 CDR H1

48	QIYPGDGDTNNGKFKG	SJ25C1 CDR H2
49	KTISSVDFYFDY	SJ25C1 CDR H3
50	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQ RPGQGLEWIGQIYPGDGDTNNGKFKGQATLTADKSSSTA YMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVDFYFDYWGGGTTVT VSS	SJ25C1 VH
51	DIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQOKP GQSPKPLIYSATYRNSGVDPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSK DLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKR	SJ25C1 VL
52	GGGGSGGGSGGGGS	Ligador
53	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQ RPGQGLEWIGQIYPGDGDTNNGKFKGQATLTADKSSSTA YMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVDFYFDYWGGGTTVT VSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRVSV TCKASQNVGTNVAWYQOKPGQSPKPLIYSATYRNSGVDP RFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGG GTKLEIKR	SJ25C1 scFv
54	HYYYGGSYAMDY	FM063 HC-CDR3
55	HTSRLHS	FM063 LC-CDR2
56	QQGNTLPYT	FM063 LC-CDR3
57	gacatccagatgaccagaccactccagcctgagcgcagcctggggcgaccggg tgaccatcagctgcggggccagccaggacatcagcaagtaacctgaactggtatcagc agaagcccgagcgcaccgcaagctgctgaictaccacaccagccggctgcacag cggcgctgcccagccggcttagcggcagcggcctccggcaccgactacagcctgacca tctccaaactggaacagggaagatatcgccactactttgcccagcagggcaacacact ggccctacacctttggcggcggaacaaagctggaaatcacccggcagcaactccggca ggcgcaagcctggcagcggcgaggggcagccaccaaggcgagggtgaagctgcag gaaagcggccctggcctggctggcccccagccagagcctgagcgtgacctgcaacgt gagcggcgtgagcctgcccactacggcgtgagctggatccggcagccccccagg aaggggcctggaatggctggcggtgactggggcagcagaccactactacaacag cgccctgaagagccggcctgaccatcatcaaggacaacagcaagagccagggtgtc ctgaagatgaacagccctgcagaccgacgacacggccatctactctgcgccaagca ctactactacggggcagctacggccaatggactactggggccaggggcaccagcgtga ccgtgagcagc	Secuencia que codifica scFv
58	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	Ligador

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar si un sujeto está en riesgo de toxicidad, que comprende ensayar el número de células que expresan receptores recombinantes en una muestra de sangre de un sujeto, habiéndosele administrado previamente al sujeto una dosis de las células que expresan receptores recombinantes, donde el sujeto está en riesgo de desarrollar una toxicidad si:
 - (i) no más de cuatro días después del inicio de la administración, el número de células que expresan receptores recombinantes en la muestra de sangre del sujeto es de al menos 2 células que expresan receptores recombinantes por microlitro;
 - (ii) no más de cinco o seis días después del inicio de la administración, el número de células que expresan receptores recombinantes en la muestra de sangre del sujeto es de al menos 5 células que expresan receptores recombinantes por microlitro o es de al menos 10 células que expresan receptores recombinantes por microlitro; o bien
 - (iii) no más de siete días después del inicio de la administración, el número de células que expresan receptores recombinantes en la muestra de sangre del sujeto es de al menos 15 células que expresan receptores recombinantes por microlitro.
2. El método de la reivindicación 1, en el que al sujeto se le administró previamente la dosis de células recombinantes que expresan receptores en relación con un método de tratamiento de una enfermedad o afección.
3. Una dosis de células que expresan un receptor recombinante para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o condición y determinar si el sujeto está en riesgo de toxicidad, en el que el método comprende:
 - (a) administrar a un sujeto que padece una enfermedad o afección la dosis de células que expresan un receptor recombinante; y
 - (b) después de administrar las células, analizar el número de células que expresan receptores recombinantes en una muestra de sangre del sujeto para determinar si el sujeto está en riesgo de desarrollar una toxicidad, donde el sujeto está en riesgo de desarrollar una toxicidad si:
 - (i) no más de cuatro días después del inicio de la administración, el número de células que expresan receptores recombinantes en la muestra de sangre del sujeto es de al menos 2 células que expresan receptores recombinantes por microlitro;
 - (ii) no más de cinco o seis días después del inicio de la administración, el número de células que expresan receptores recombinantes en la muestra de sangre del sujeto es de al menos 5 células que expresan receptores recombinantes por microlitro o es de al menos 10 células que expresan receptores recombinantes por microlitro; o bien
 - (iii) no más de siete días después del inicio de la administración, el número de células que expresan receptores recombinantes en la muestra de sangre del sujeto es de al menos 15 células que expresan receptores recombinantes por microlitro.
4. El método de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, o la dosis de células que expresan un receptor recombinante para su uso según la reivindicación 3, en el que el ensayo comprende el uso de un método de detección basado en ácidos nucleicos o citometría de flujo, opcionalmente un método de detección basado en la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 4, o la dosis de células que expresan un receptor recombinante para su uso según la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en el que el sujeto está en riesgo de desarrollar una toxicidad si, además, el nivel, la cantidad o la concentración de interleucina-15 (IL-15) detectada en una muestra de sangre o suero del sujeto es igual o superior a 30 pg/mL.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 y 5, o la dosis de células que expresan un receptor recombinante para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en el que la muestra se obtiene del sujeto en o no más de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días o 5 días después del inicio de la administración de la terapia celular.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 4-6, o la dosis de células que expresan un receptor recombinante para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 3-6, en el que:
 - (a) la toxicidad es una neurotoxicidad de grado 4 o superior, o de grado 5, o una neurotoxicidad de grado 3 al menos prolongada; o
 - (b) la toxicidad es o está asociada a un edema cerebral.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 4-7, o la dosis de células que expresan un receptor recombinante para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 3-7, en el que el receptor recombinante es un receptor de antígeno quimérico (CAR).
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2 y 4-8, o la dosis de células que expresan un receptor

recombinante para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 3-8, en el que la enfermedad o afección es un cáncer, opcionalmente en el que el cáncer es un mieloma, un linfoma o una leucemia.

- 5 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2 y 4-9, o la dosis de células que expresan un receptor recombinante para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 3-9, en el que la enfermedad o afección es una neoplasia maligna de células B, opcionalmente en el que la neoplasia maligna de células B se selecciona del grupo que consiste en leucemia linfoblástica aguda (ALL), ALL en adultos, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma no Hodgkin (NHL) y linfoma difuso de grandes células B (DLBCL).
- 10 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 4-10, o la dosis de células que expresan un receptor recombinante para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 3-10, en el que el receptor recombinante se dirige a un antígeno asociado con una neoplasia de células B, opcionalmente en el que el antígeno es o incluye CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Igkappa, Iglambda, CD79a, CD79b o CD30.
- 15 12. La dosis de células que expresan un receptor recombinante para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 3-11, en la que, si se determina que el sujeto está en riesgo de desarrollar una toxicidad, el método comprende además interrumpir la administración de las células que expresan un receptor recombinante, administrar al sujeto una dosis inferior de la dosis de células que expresan un receptor recombinante, administrar al sujeto células que expresan un receptor recombinante diferente; y/o administrar al sujeto un agente capaz de tratar, prevenir, retrasar o atenuar el desarrollo de la
20 toxicidad.
- 25 13. La dosis de células que expresan un receptor recombinante para su uso según la reivindicación 12, en la que el agente es un esteroide; un antagonista o inhibidor de un receptor de citocina, opcionalmente en la que el receptor de citocina es el receptor de IL-6, el receptor CD122 (receptor de IL-2Rbeta) o CCR2; o un inhibidor de una citocina, opcionalmente en la que la citocina es IL-6, MCP-1, IL-10, IFN- γ , IL-8 o IL-18.
- 30 14. La dosis de células que expresan un receptor recombinante para su uso según la reivindicación 13, en la que el esteroide es un corticosteroide, opcionalmente en la que el corticosteroide es un glucocorticoide, opcionalmente en la que el glucocorticoide es dexametasona.
- 35 15. La dosis de células que expresan un receptor recombinante para su uso según la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en la que el agente es tocilizumab, siltuximab, sarilumab, olokizumab (CDP6038), elsilimomab, ALD518/BMS-945429, sirukumab (CNTO 136), CPSI-2634, ARGX-109, FE301 o FM101.

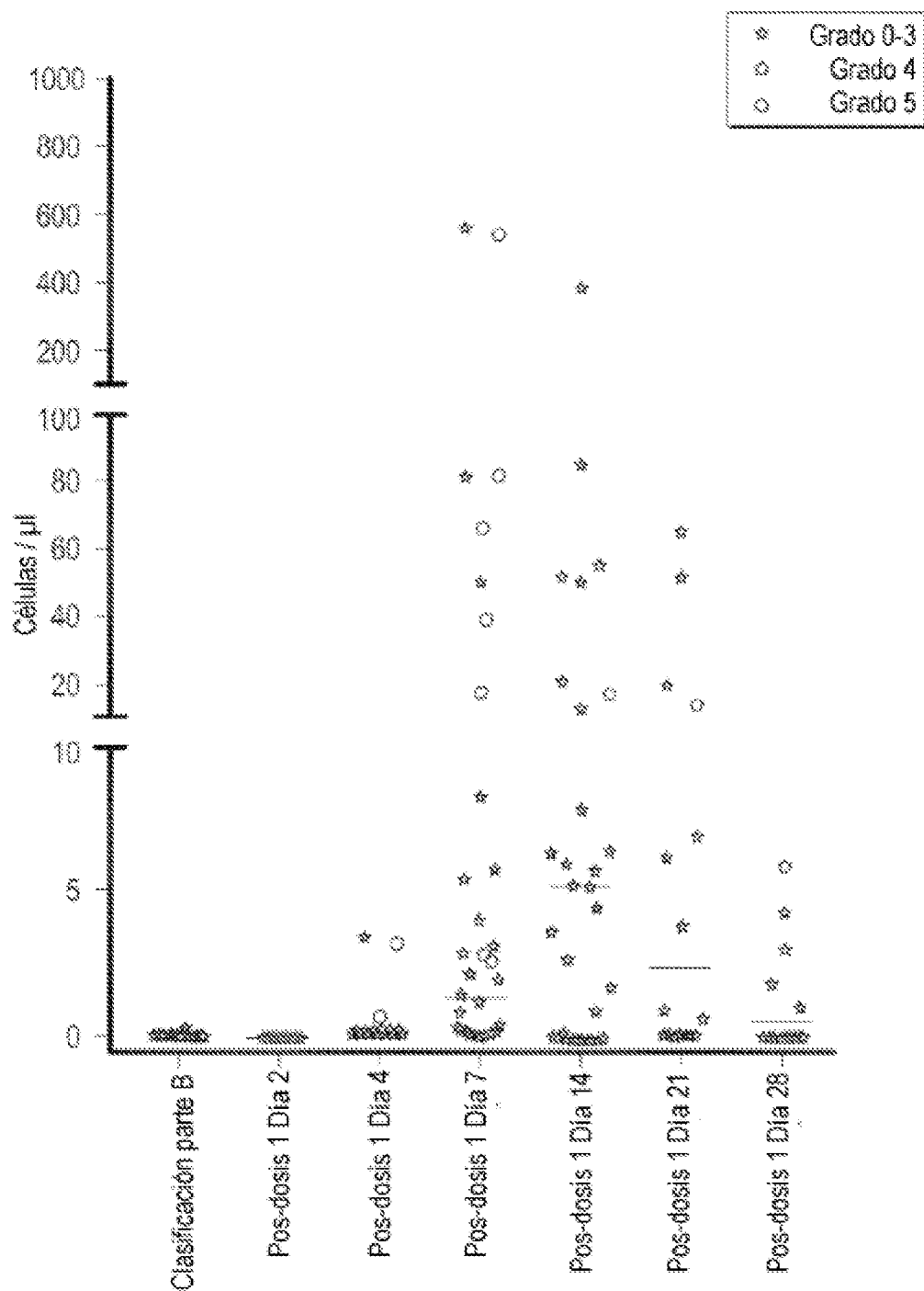
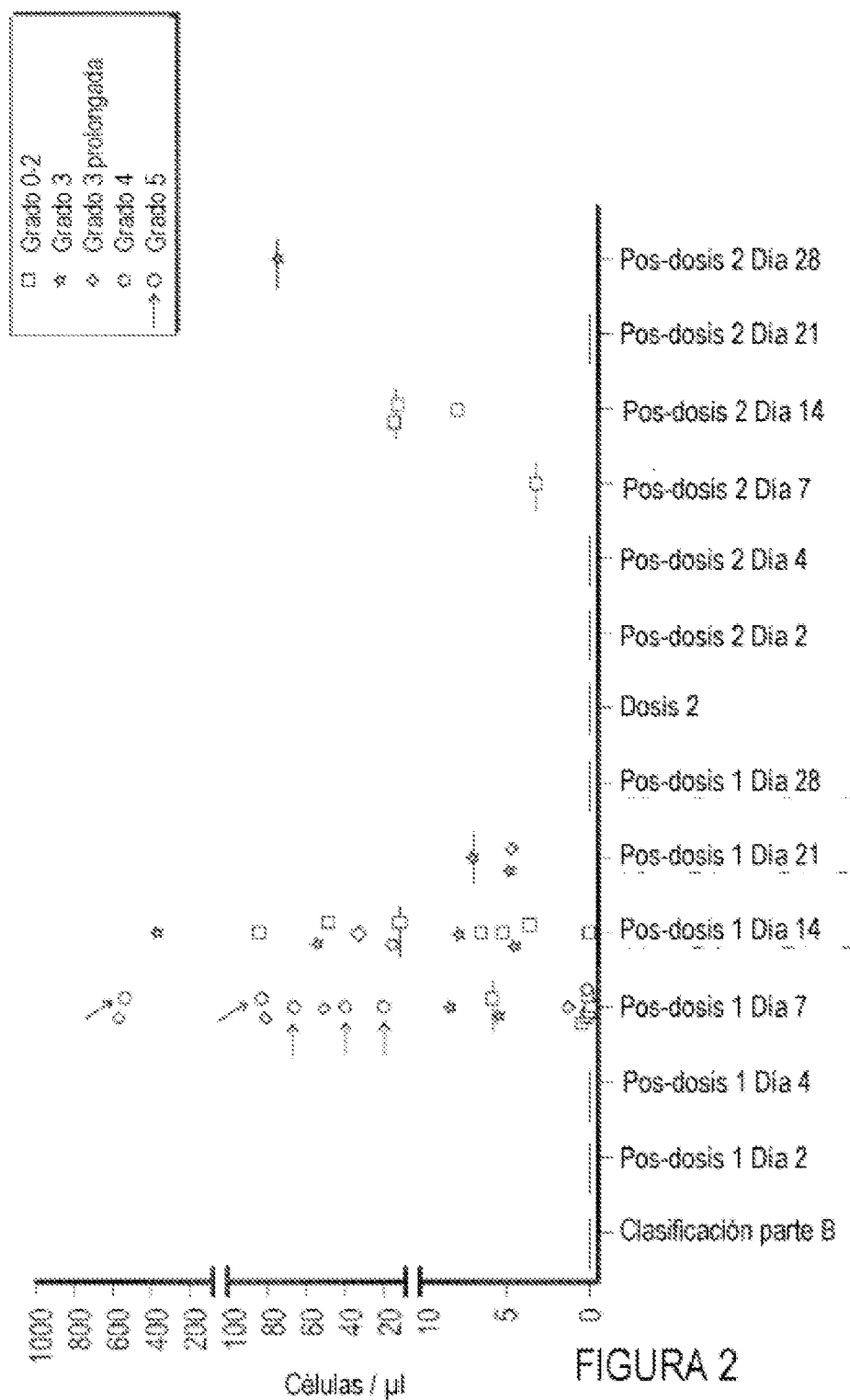


FIGURA 1



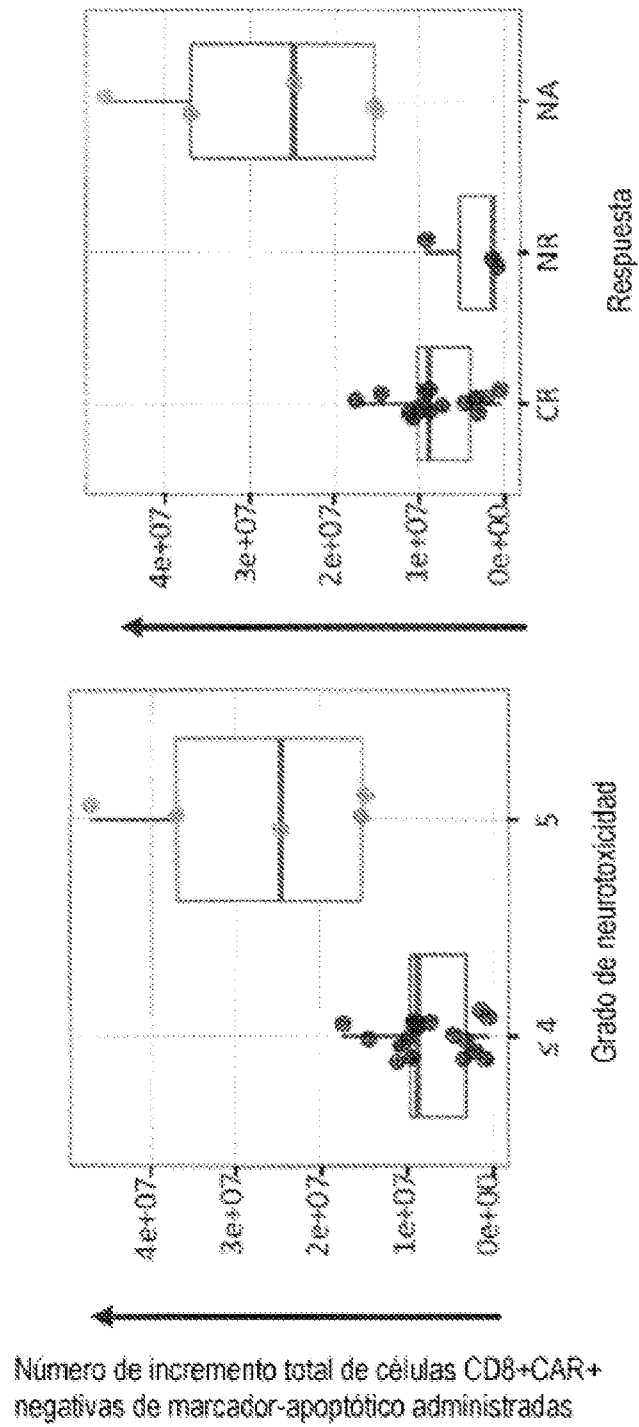


FIGURA 3A

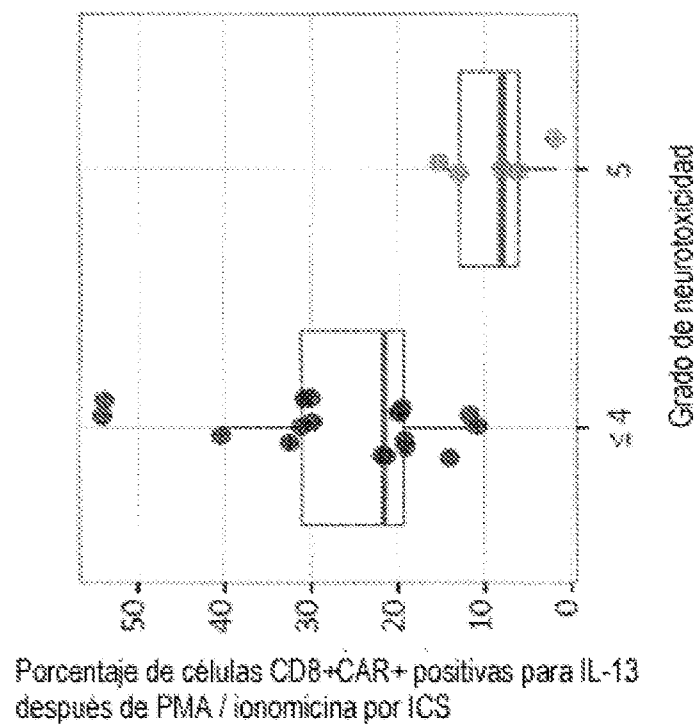
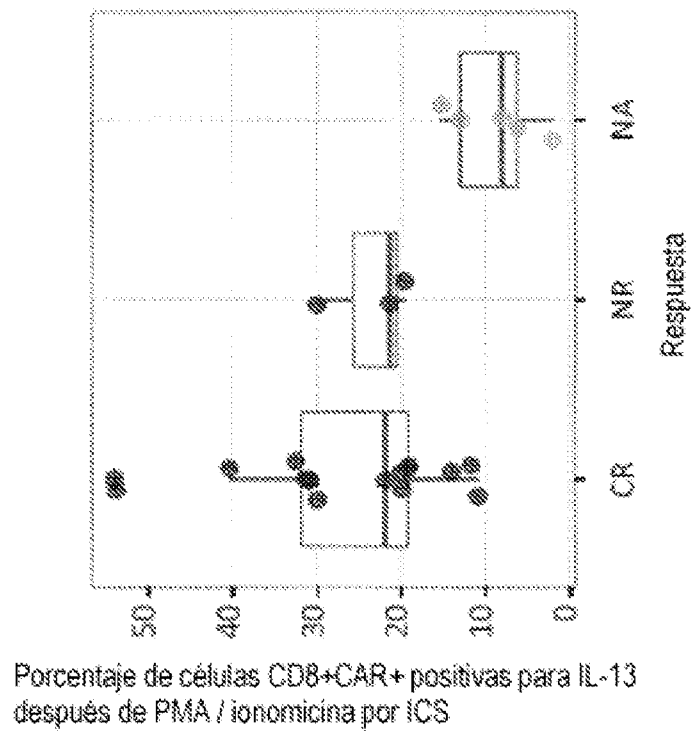


FIGURA 3B

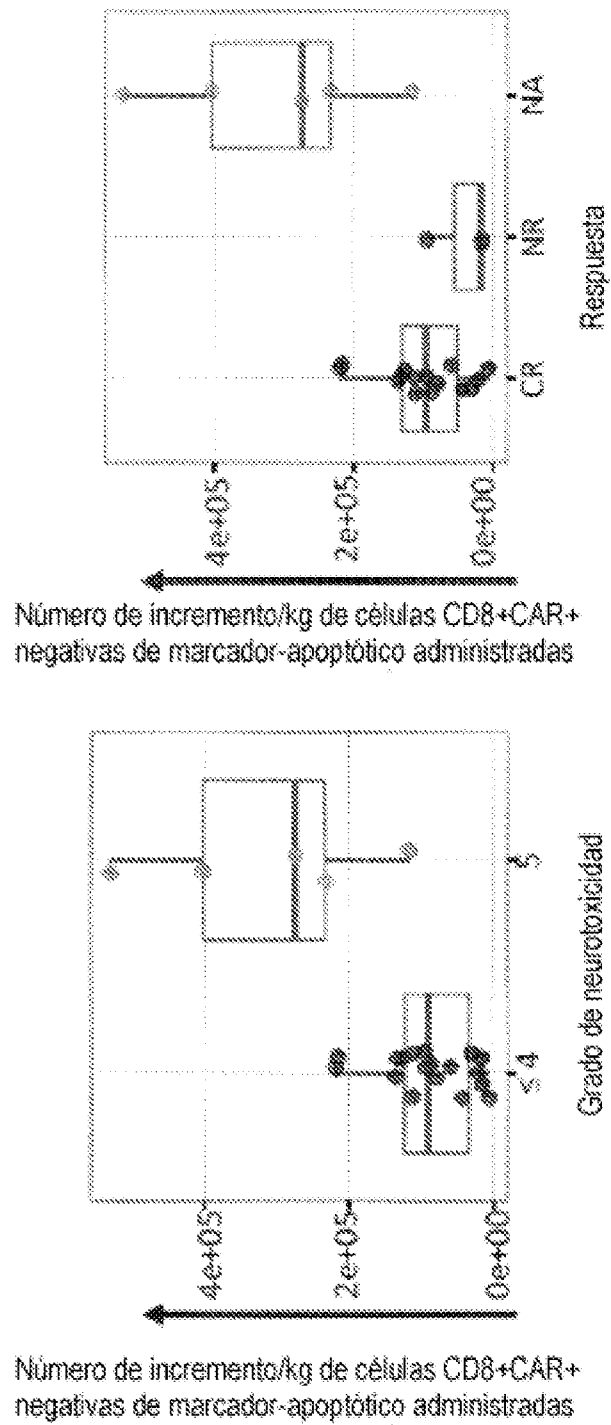


FIGURA 3C

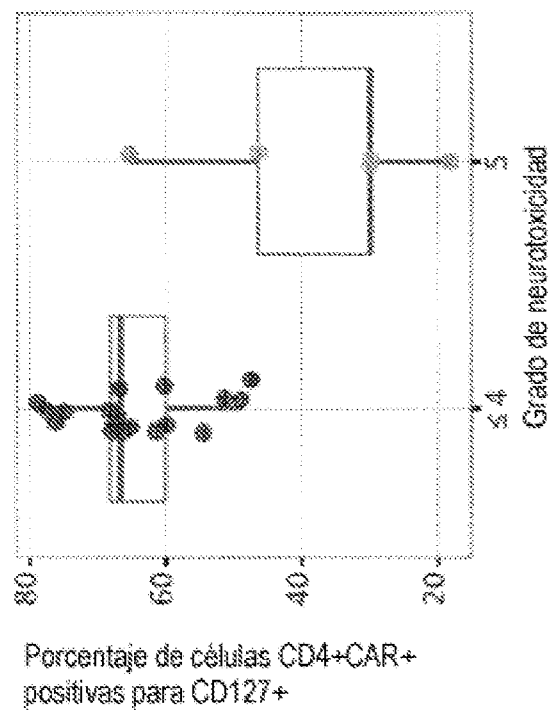
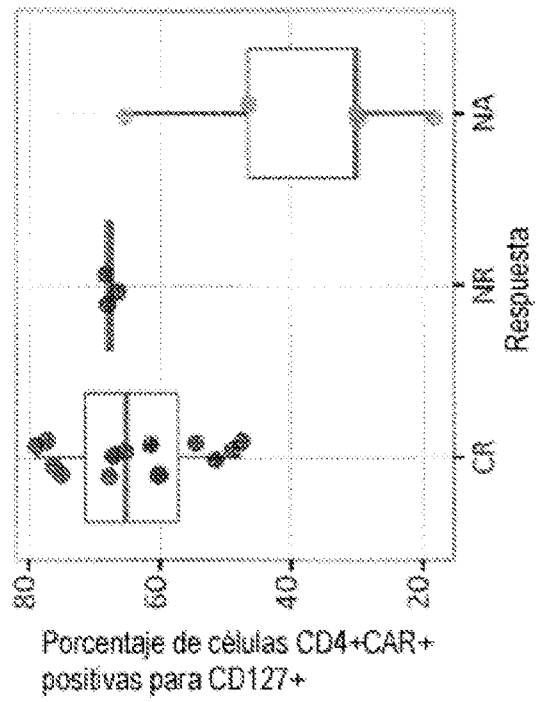


FIGURA 3D

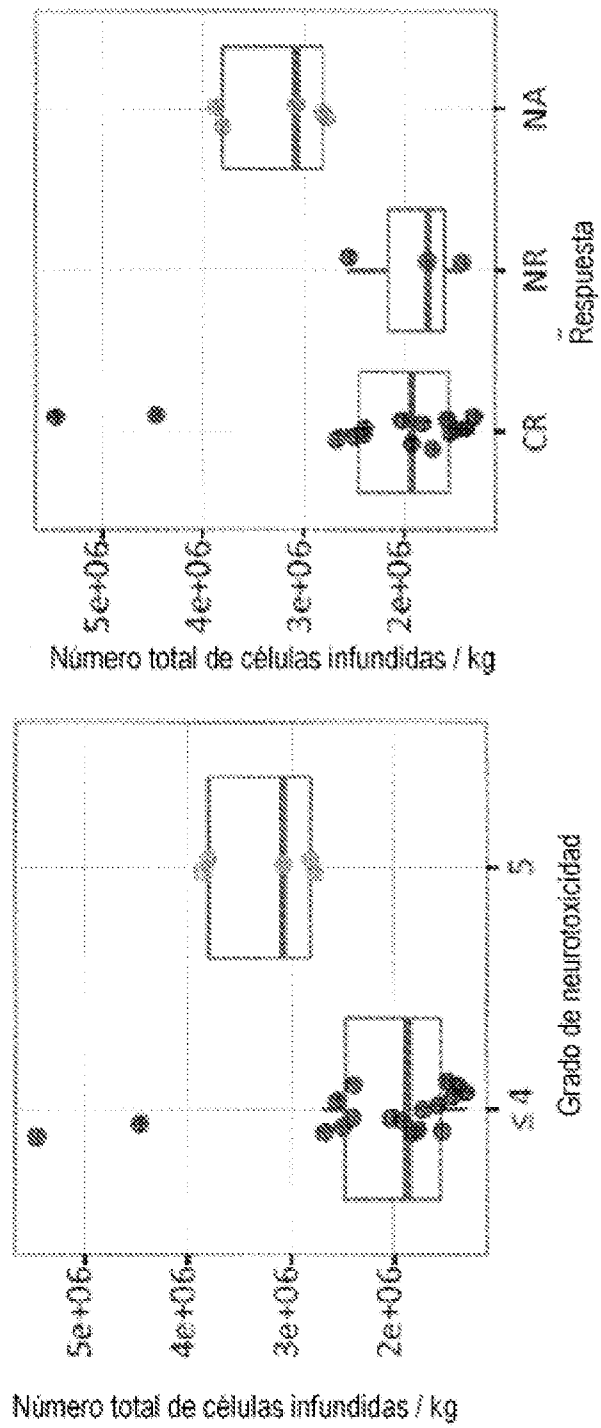


FIGURA 3E

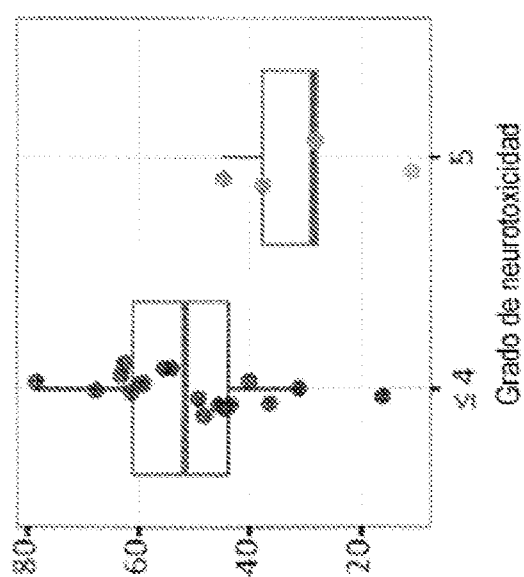
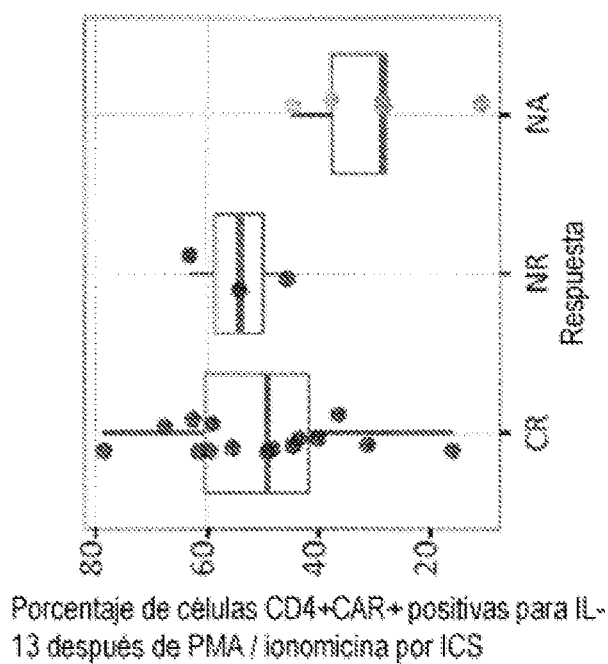
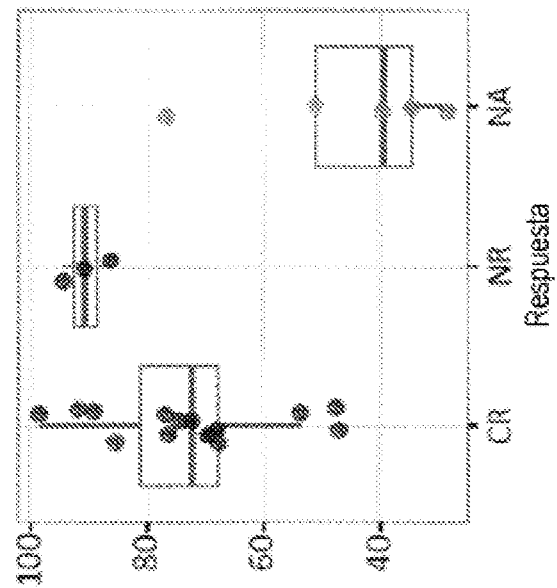
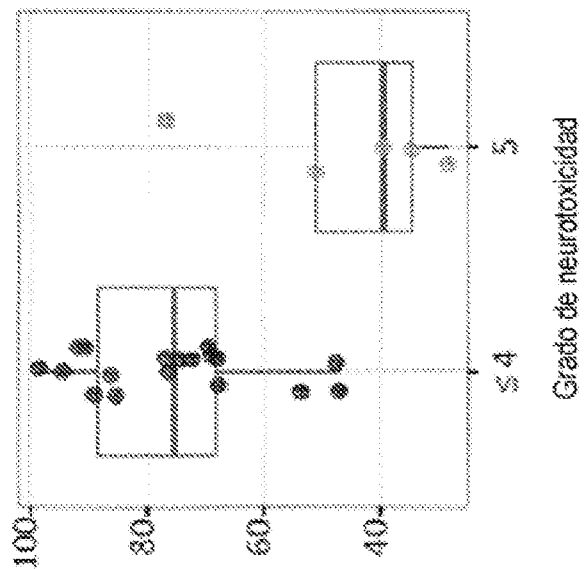


FIGURA 3F



Frecuencia de células apoptóticas negativas de marcador entre células CD8+CAR administradas



Frecuencia de células apoptóticas positivas de marcador entre células CD8+CAR administradas

FIGURA 3G

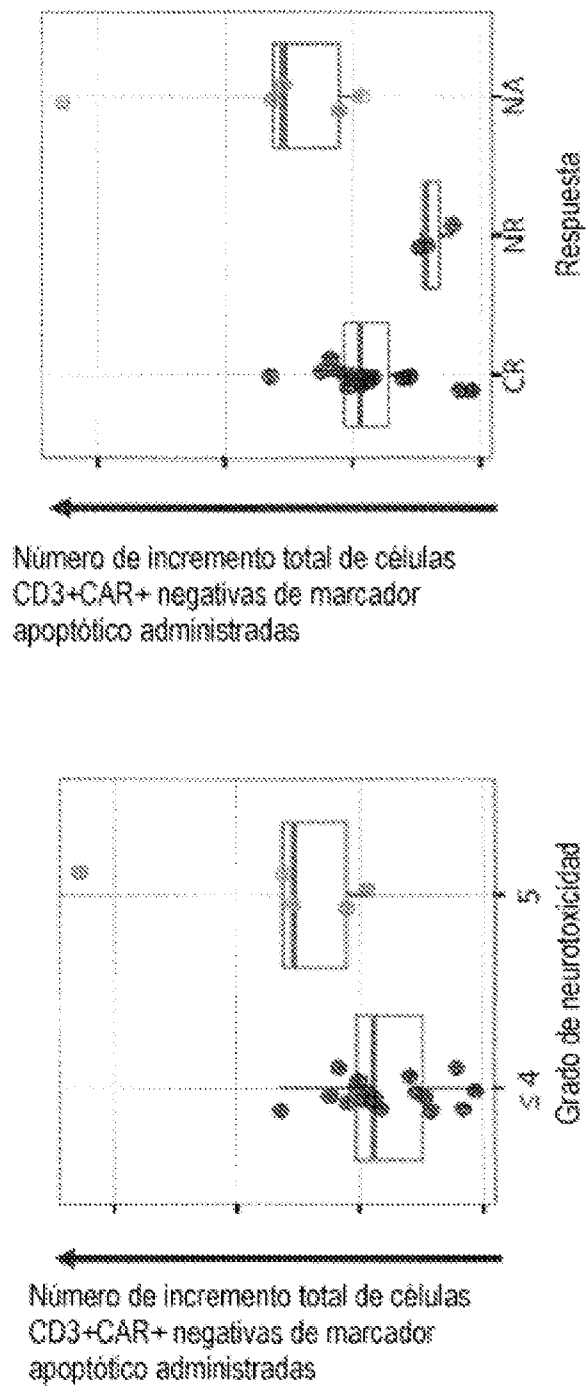


FIGURA 3I

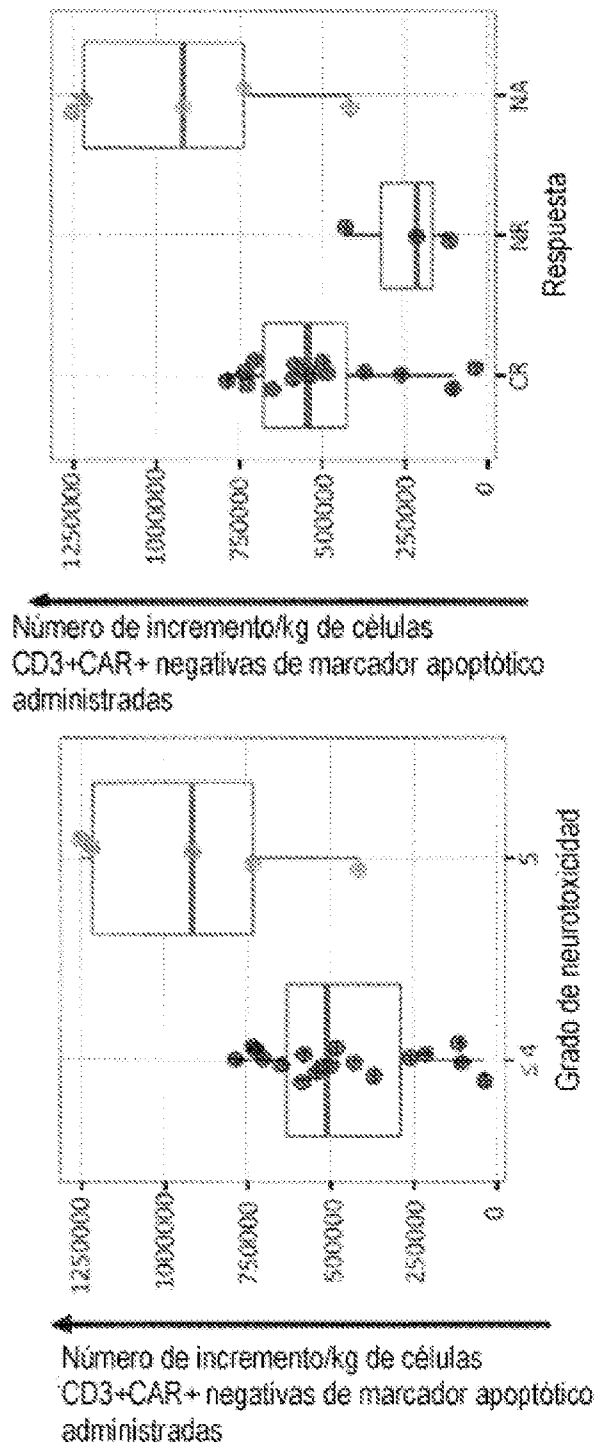


FIGURA 3J

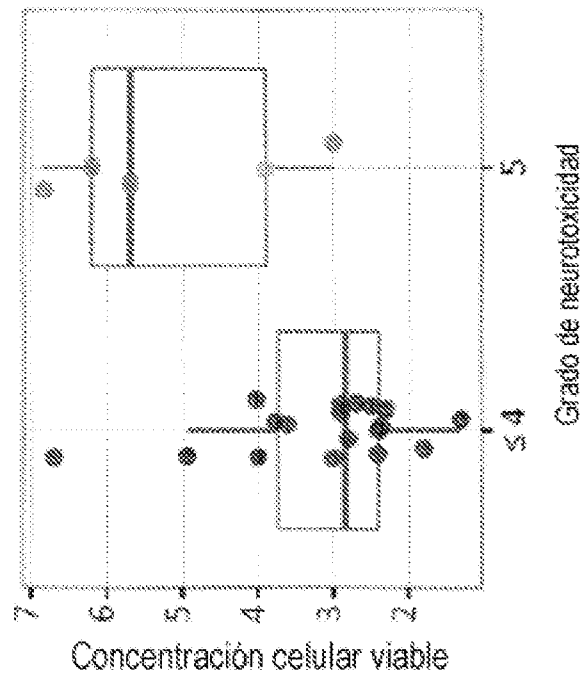
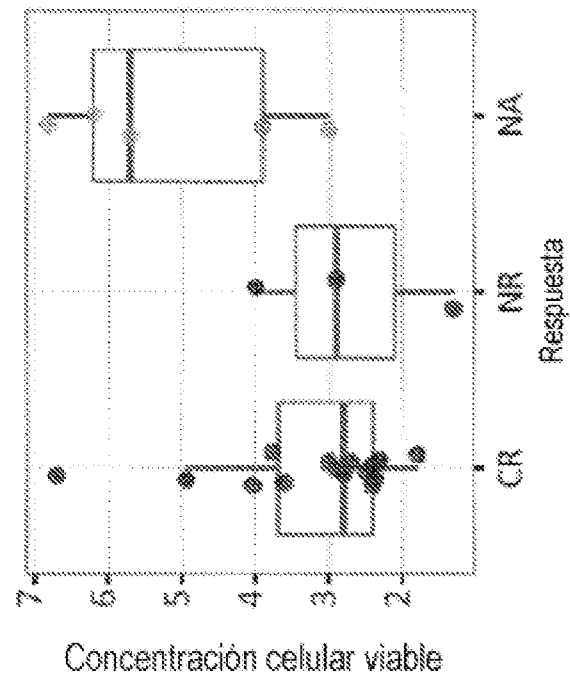


FIGURA 3K

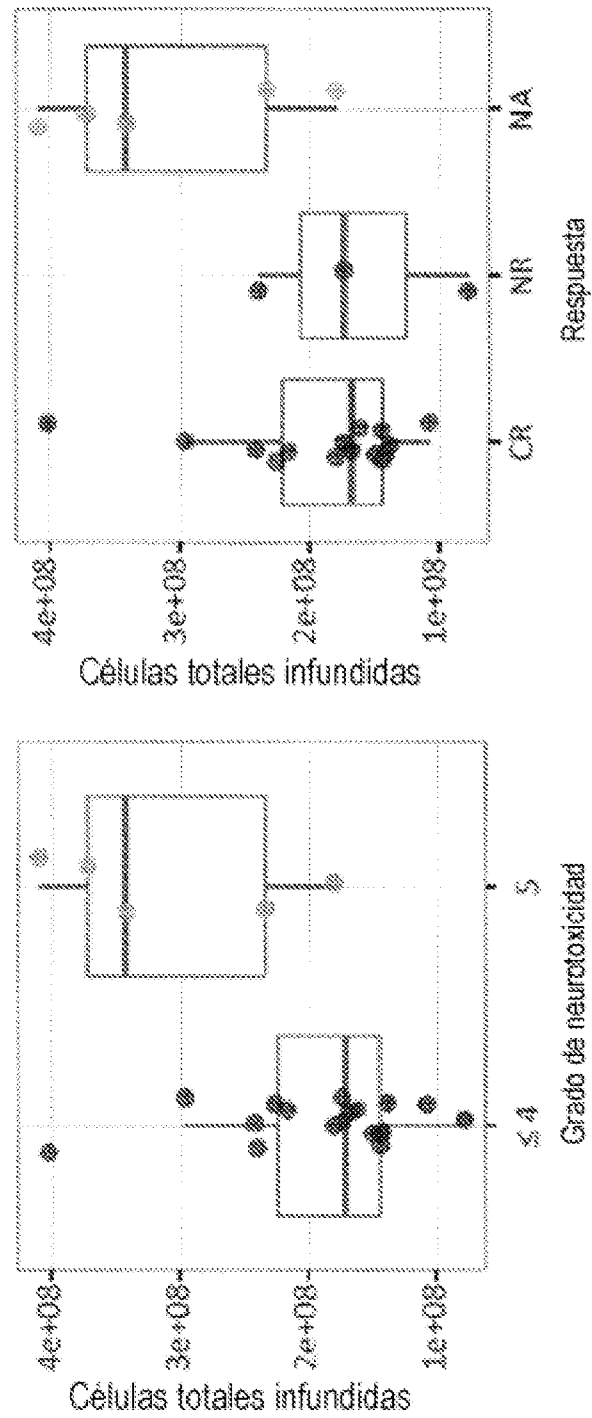


FIGURA 3L

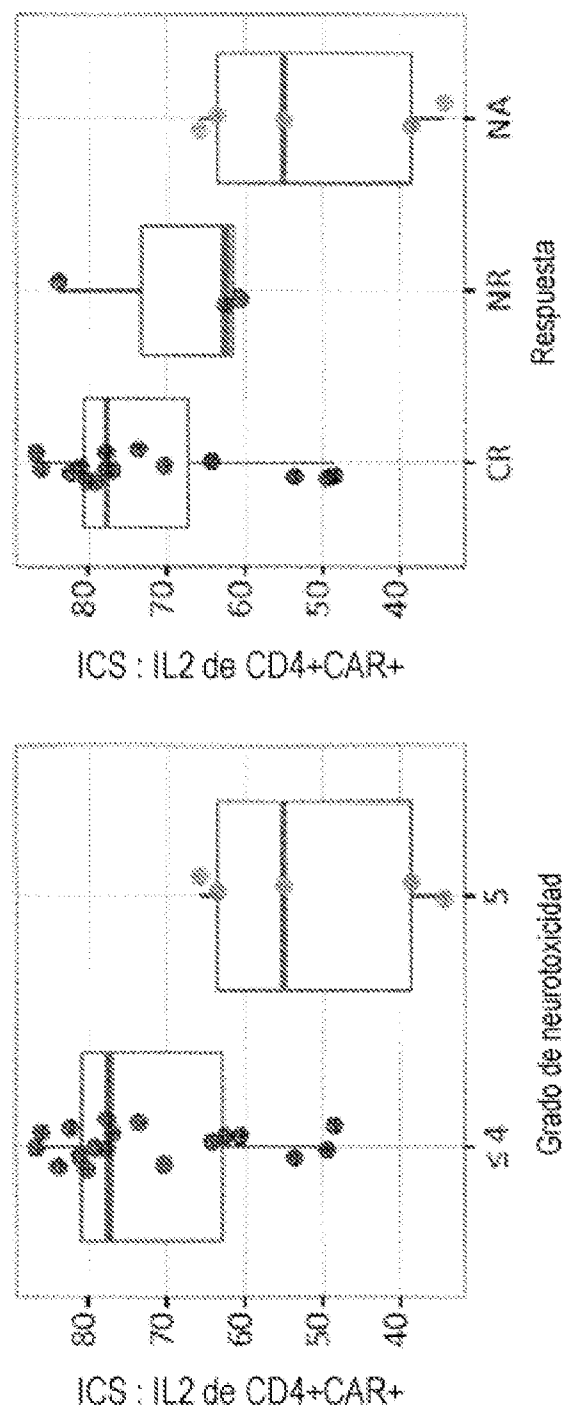


FIGURA 3M

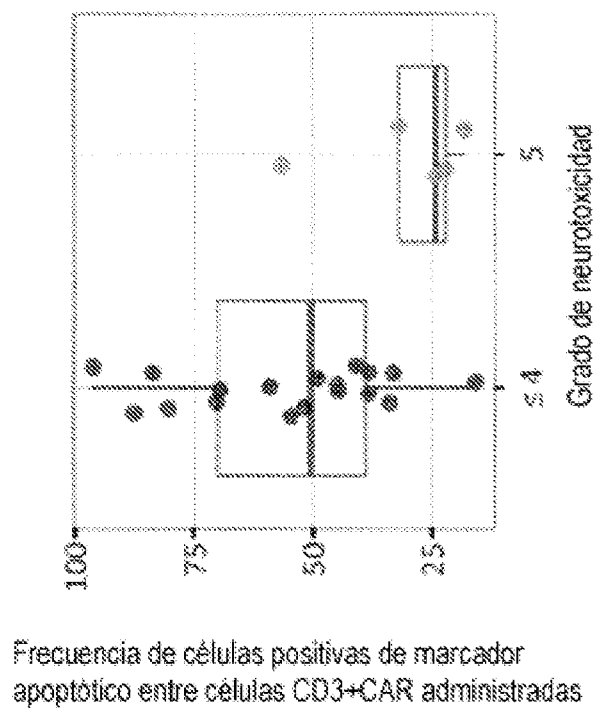
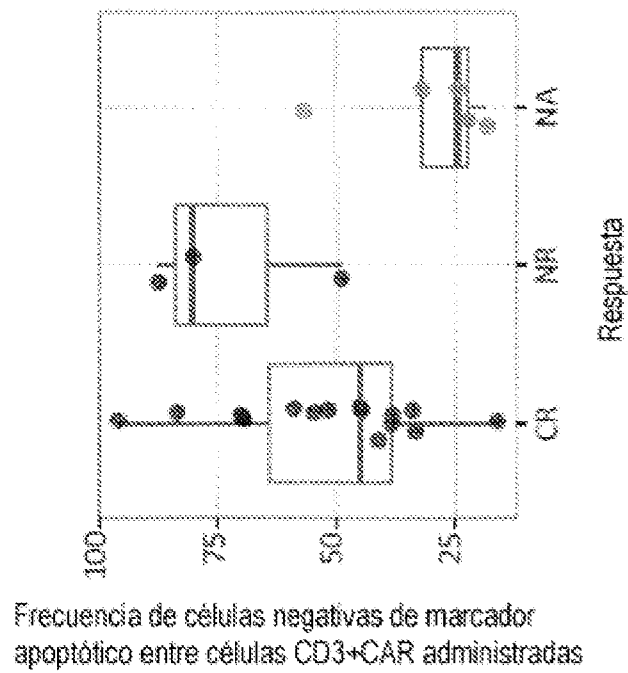


FIGURA 3N

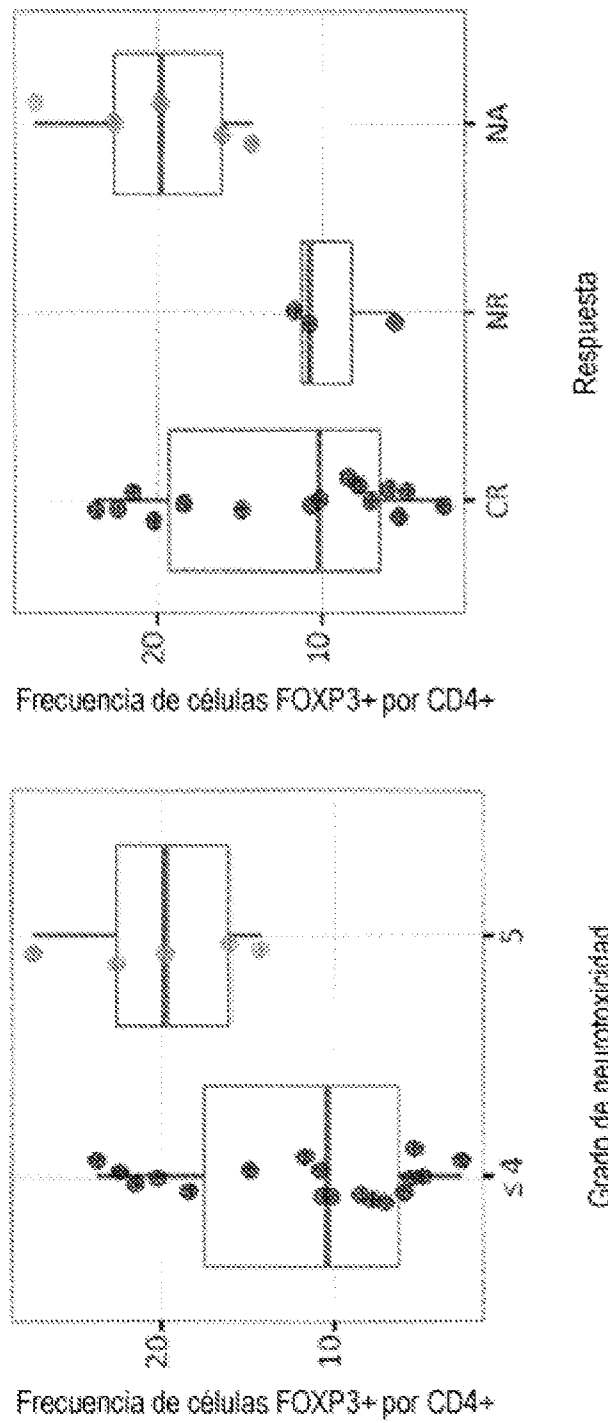


FIGURA 30

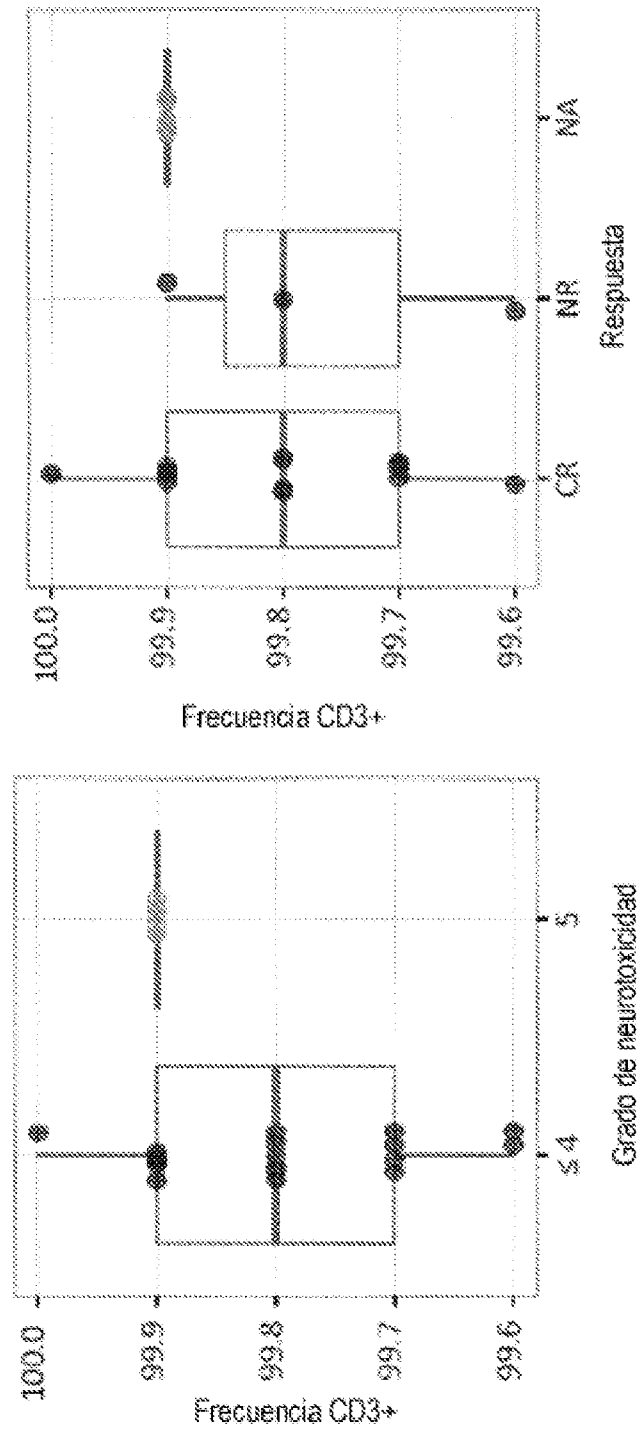


FIGURA 3P

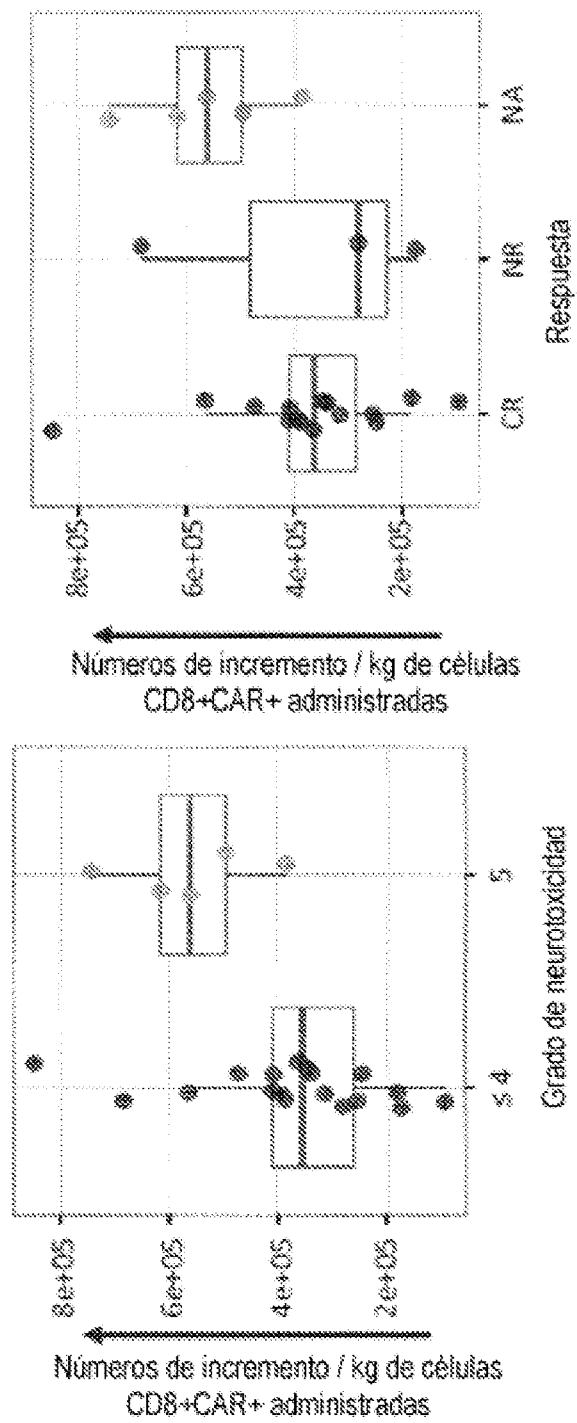
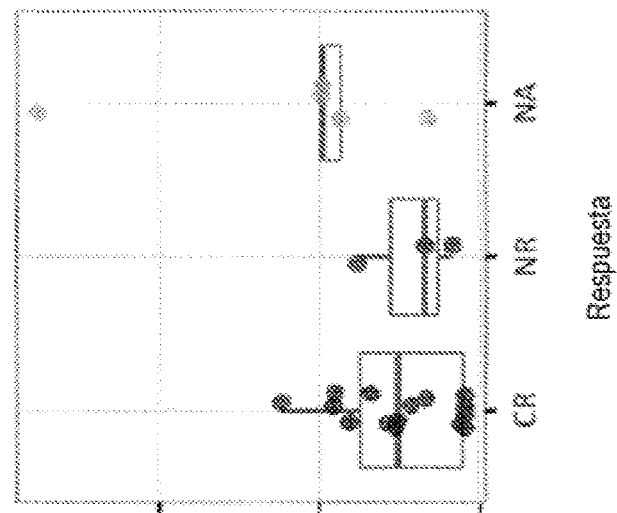
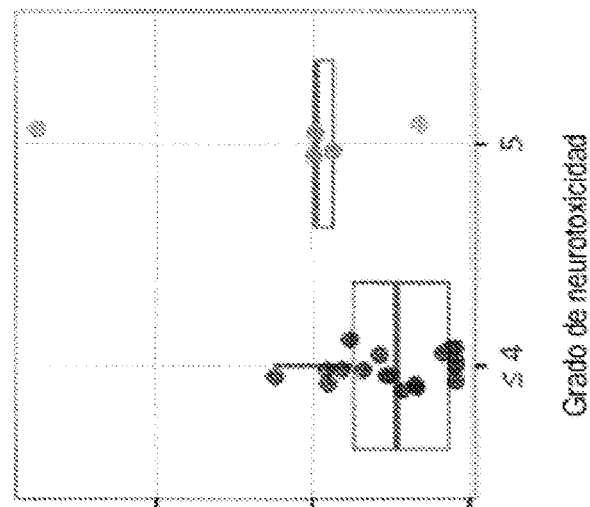


FIGURA 3Q

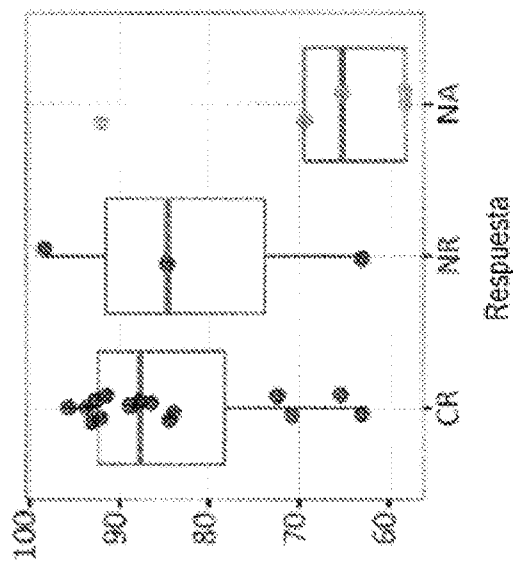


Producción de IL-10 específica de no antígeno/CAR
por células totales (estimulo CD3 / 28)

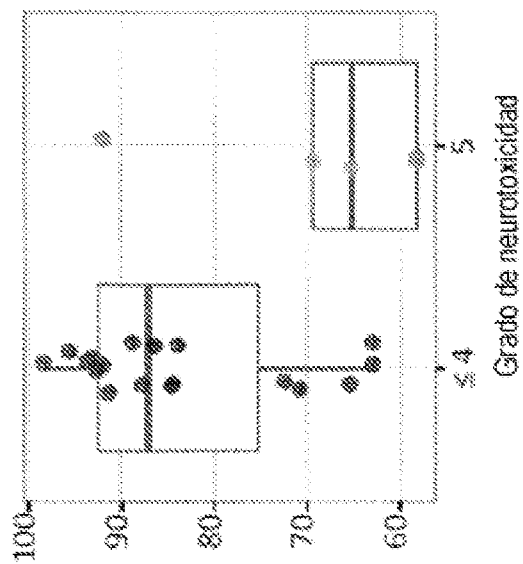


Producción de IL-10 específica de no antígeno/CAR
por células totales (estimulo CD3 / 28)

FIGURA 3R



Porcentaje de células CD4+CAR+ positivas para TNFα después de PMA / ionomicina por ICS



Porcentaje de células CD4+CAR+ positivas para TNFα después de PMA / ionomicina por ICS

FIGURA 3S

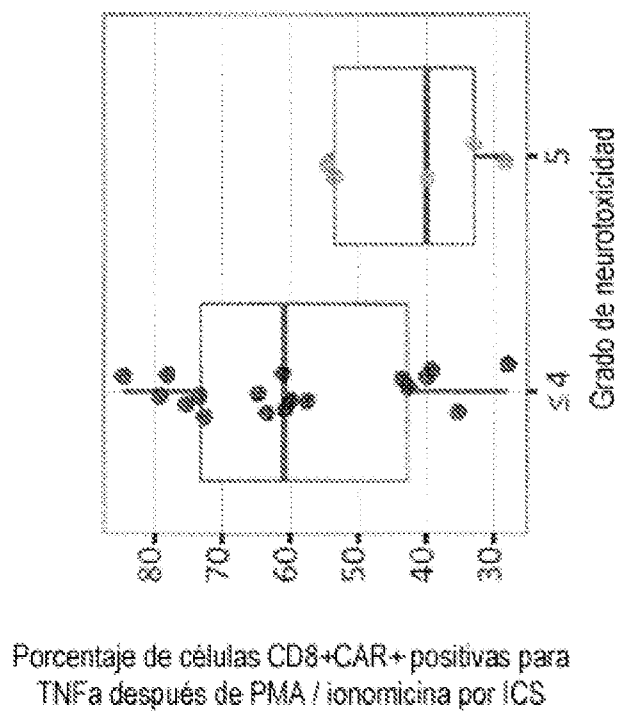
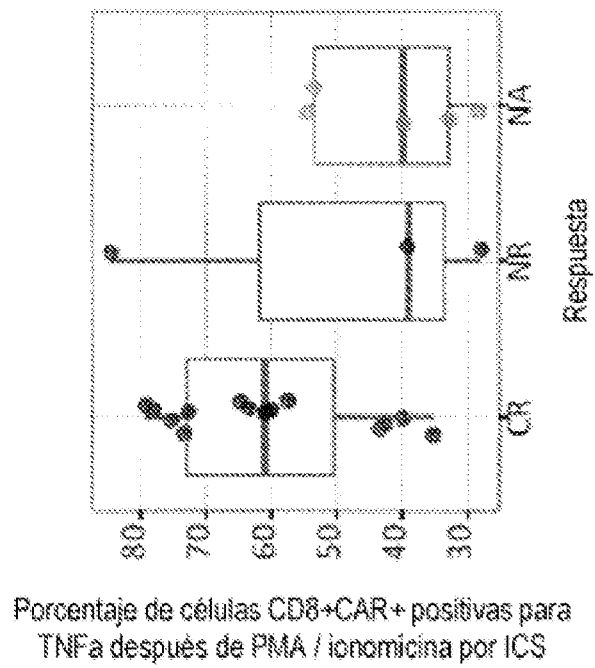
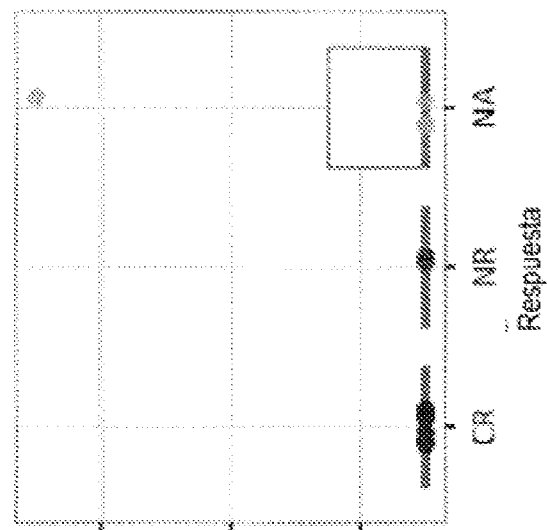
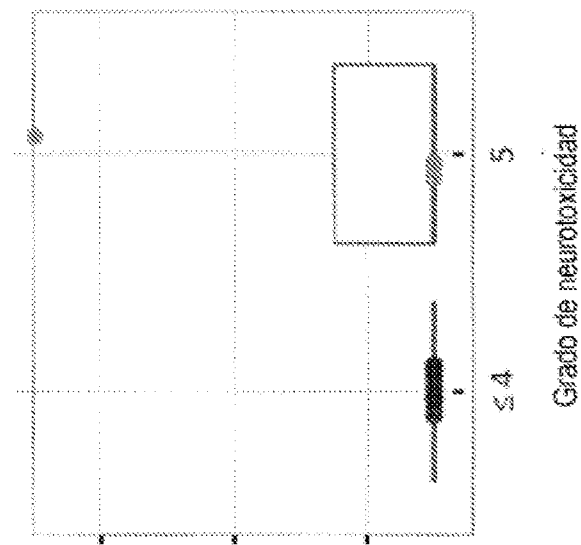


FIGURA 3T



Producción de IL-6 específica de no antígeno/CAR
por células totales (estimulo CD3 / 28)



Producción de IL-6 específica de no antígeno/CAR
por células totales (estimulo CD3 / 28)

FIGURA 3U

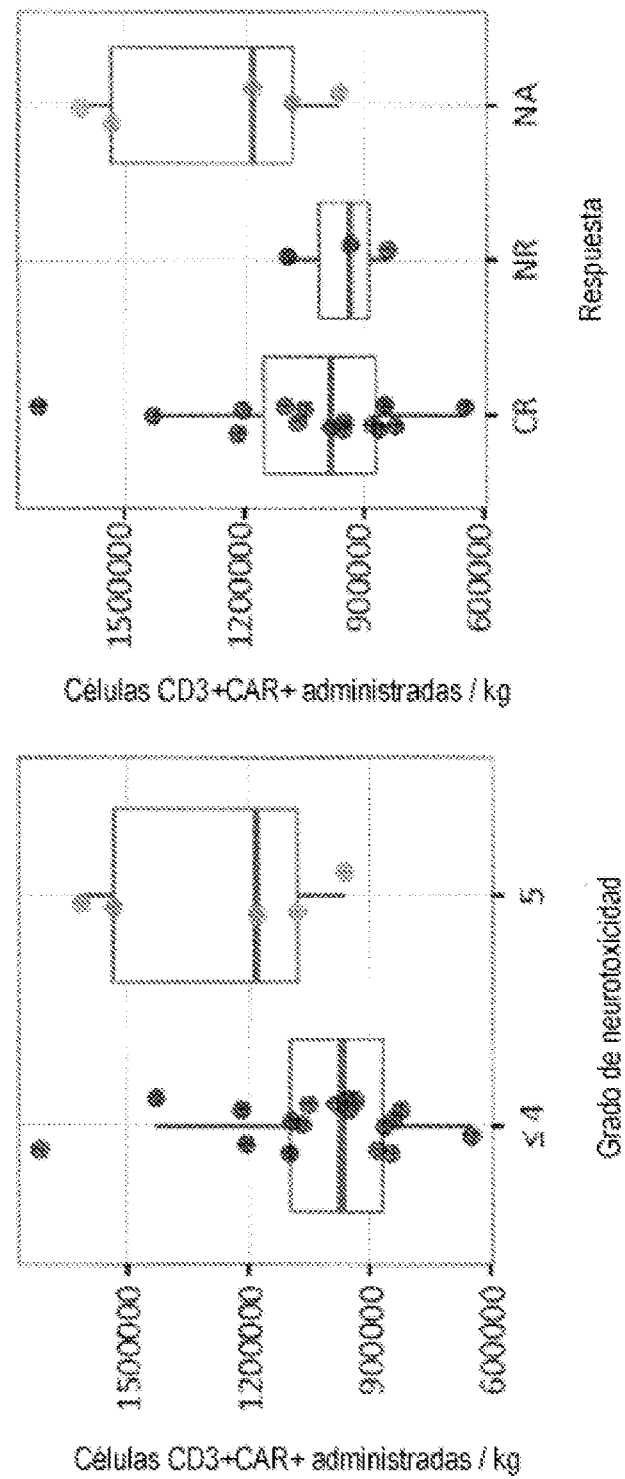


FIGURA 3V

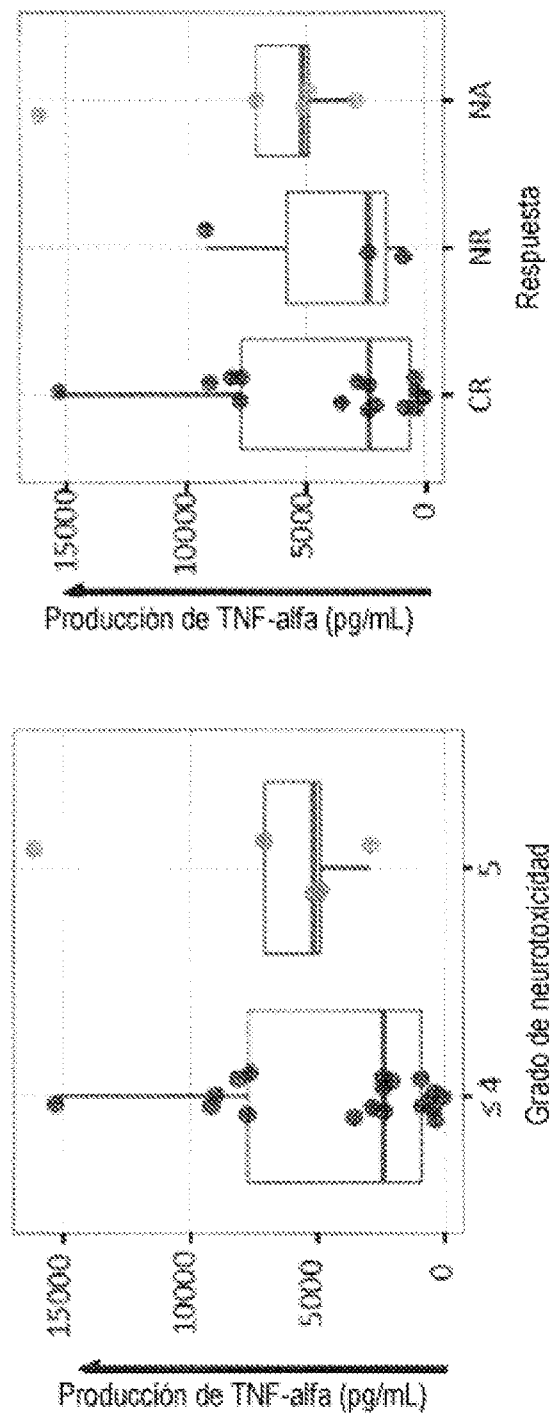


FIGURA 4

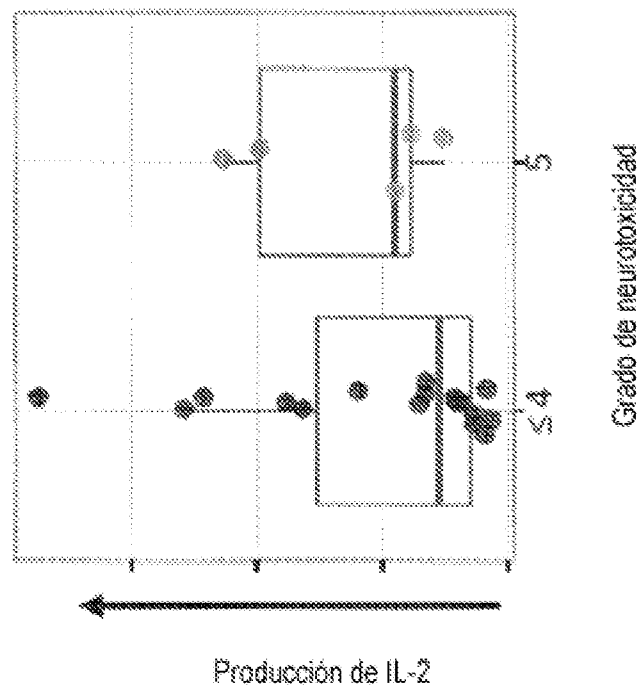
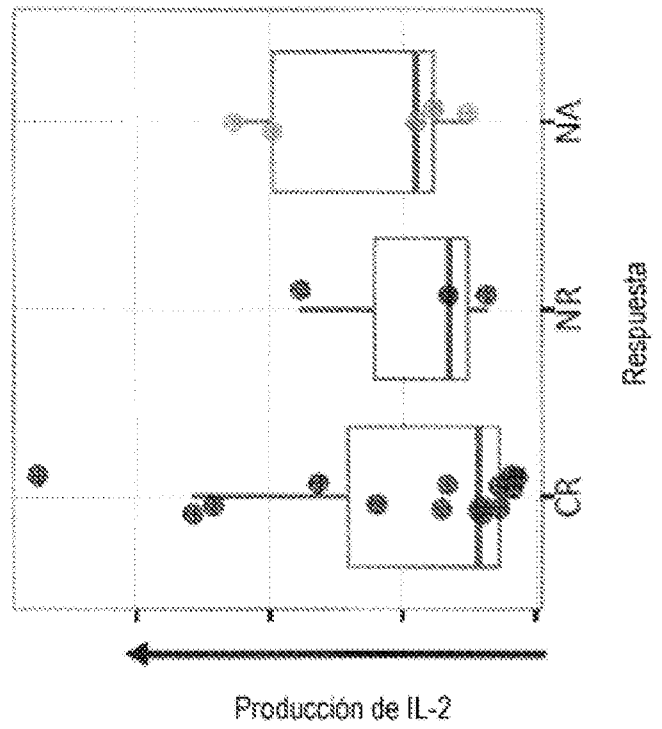


FIGURA 5A

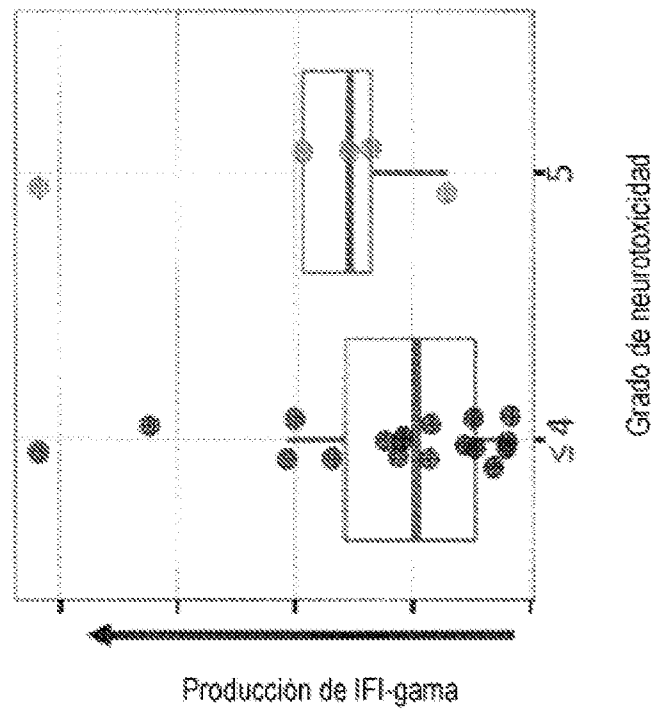
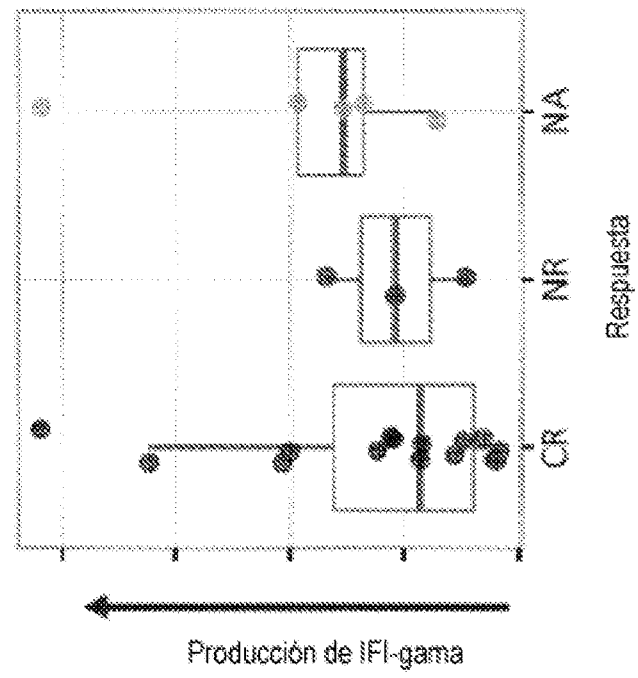


FIGURA 5B

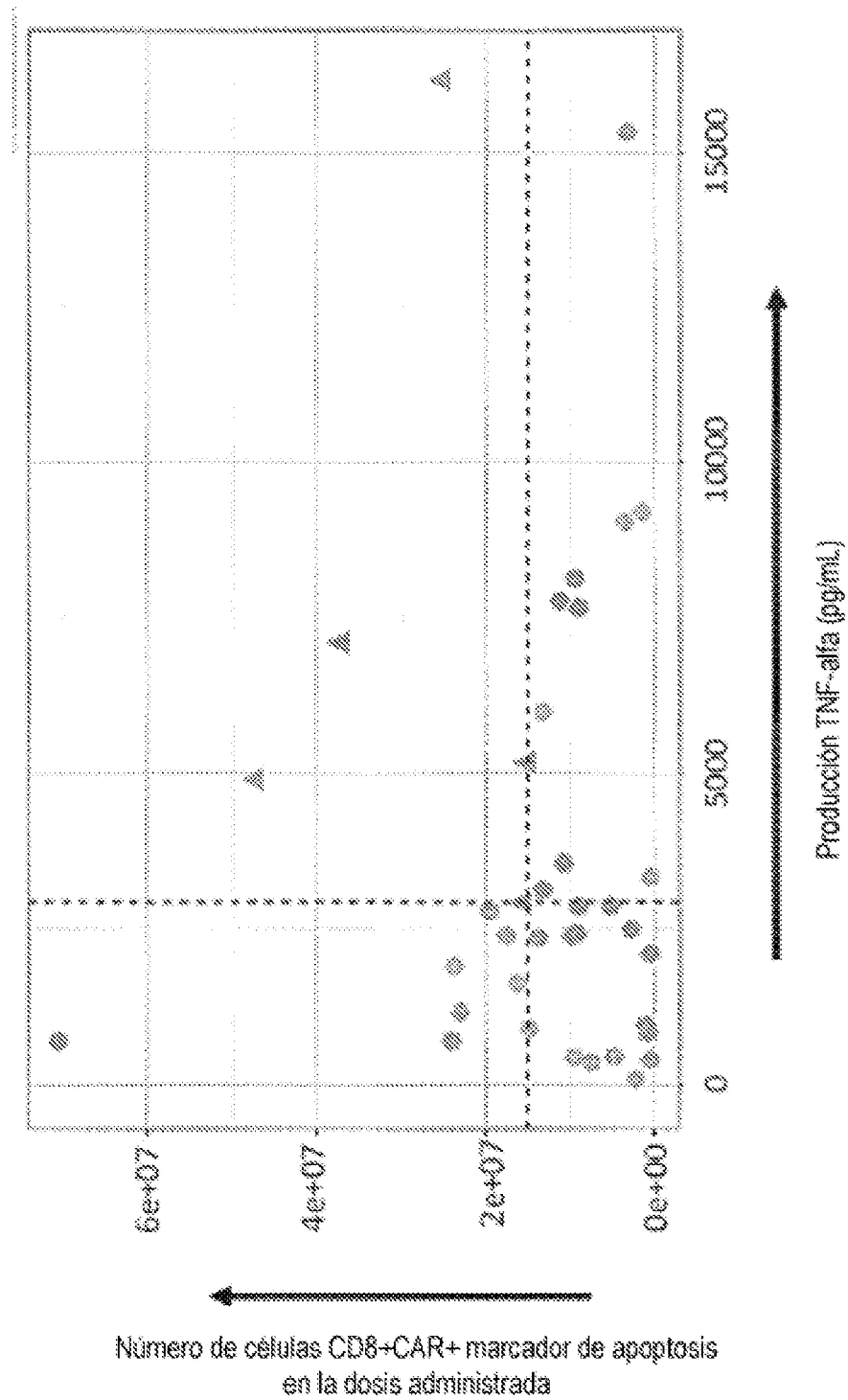
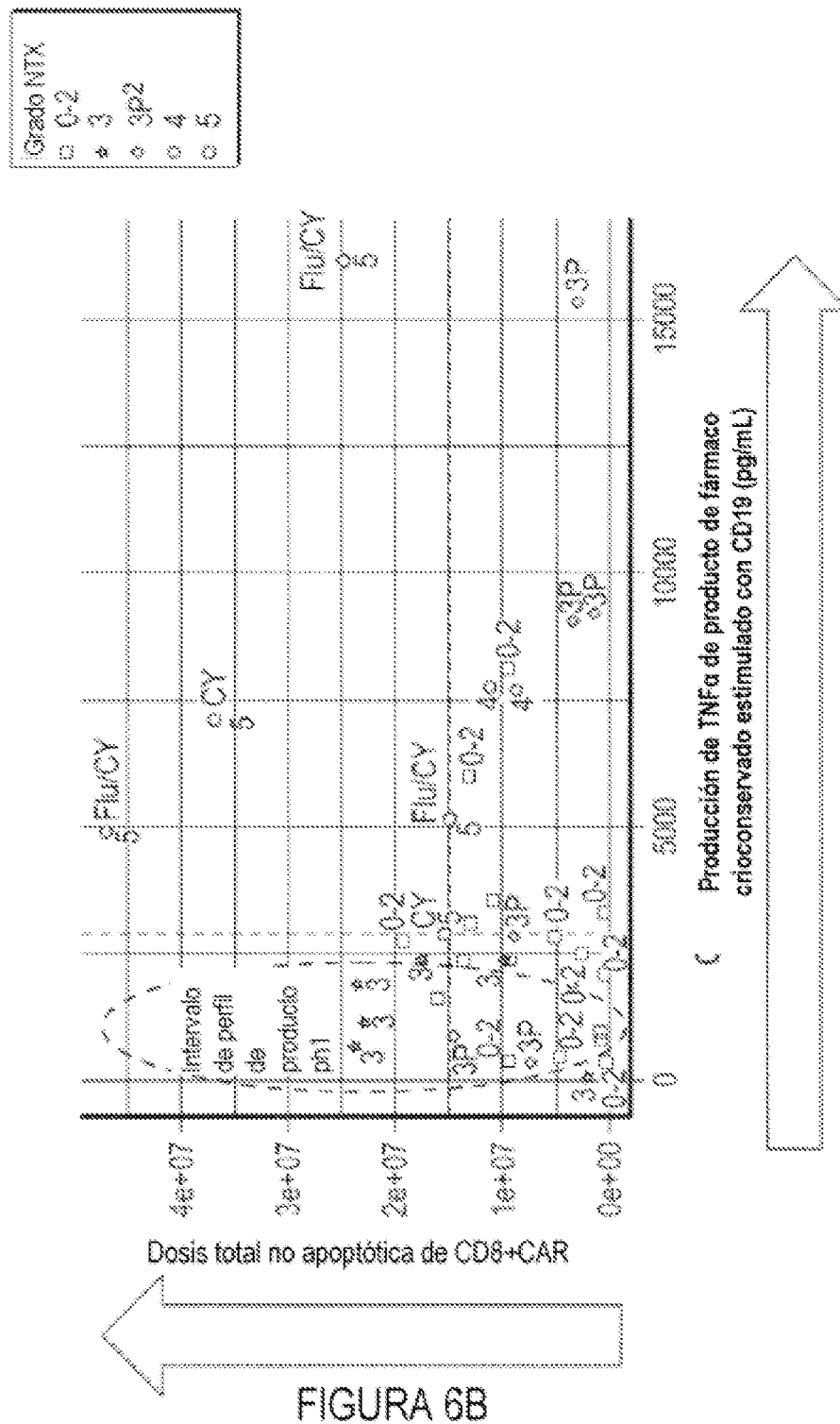
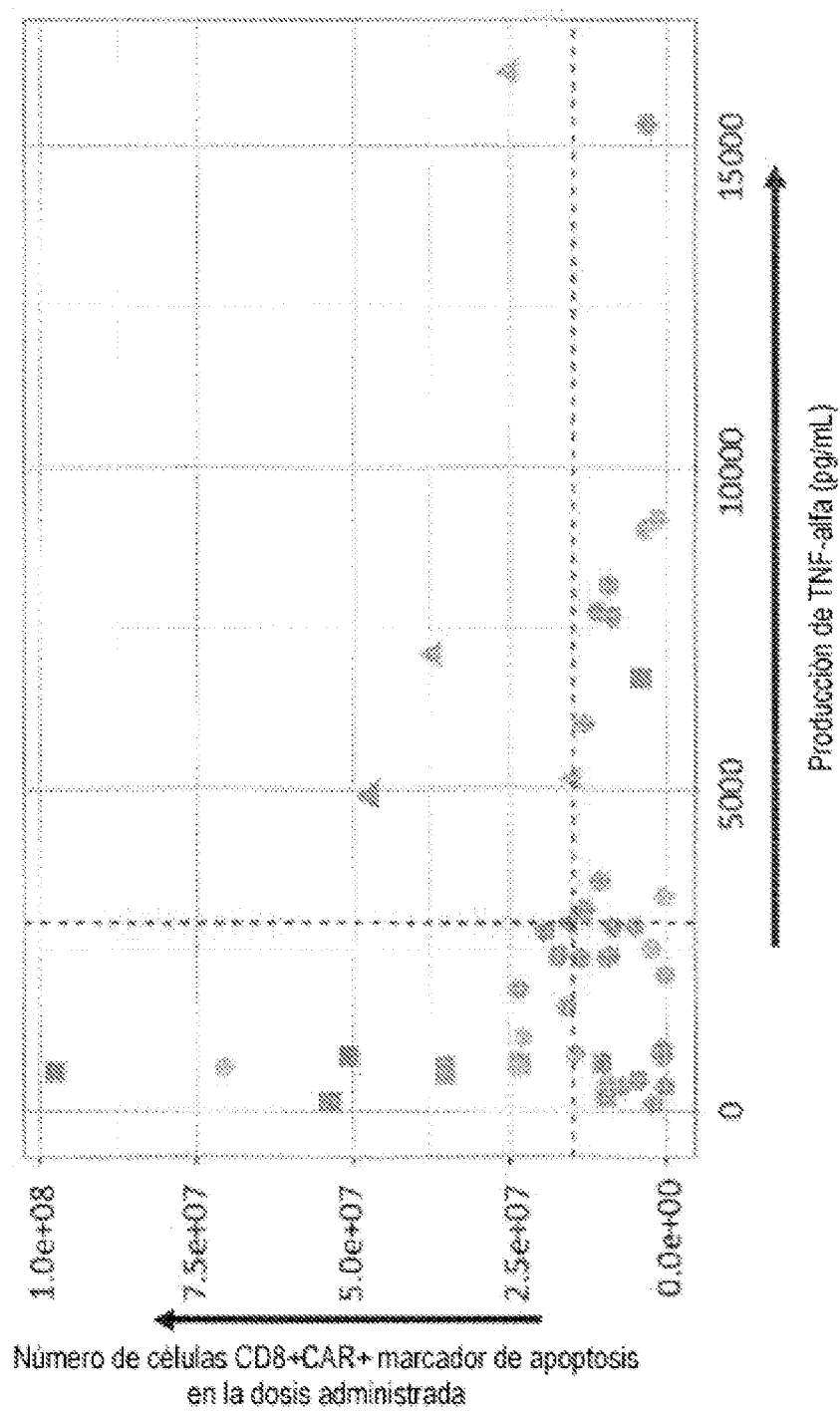


FIGURA 6A





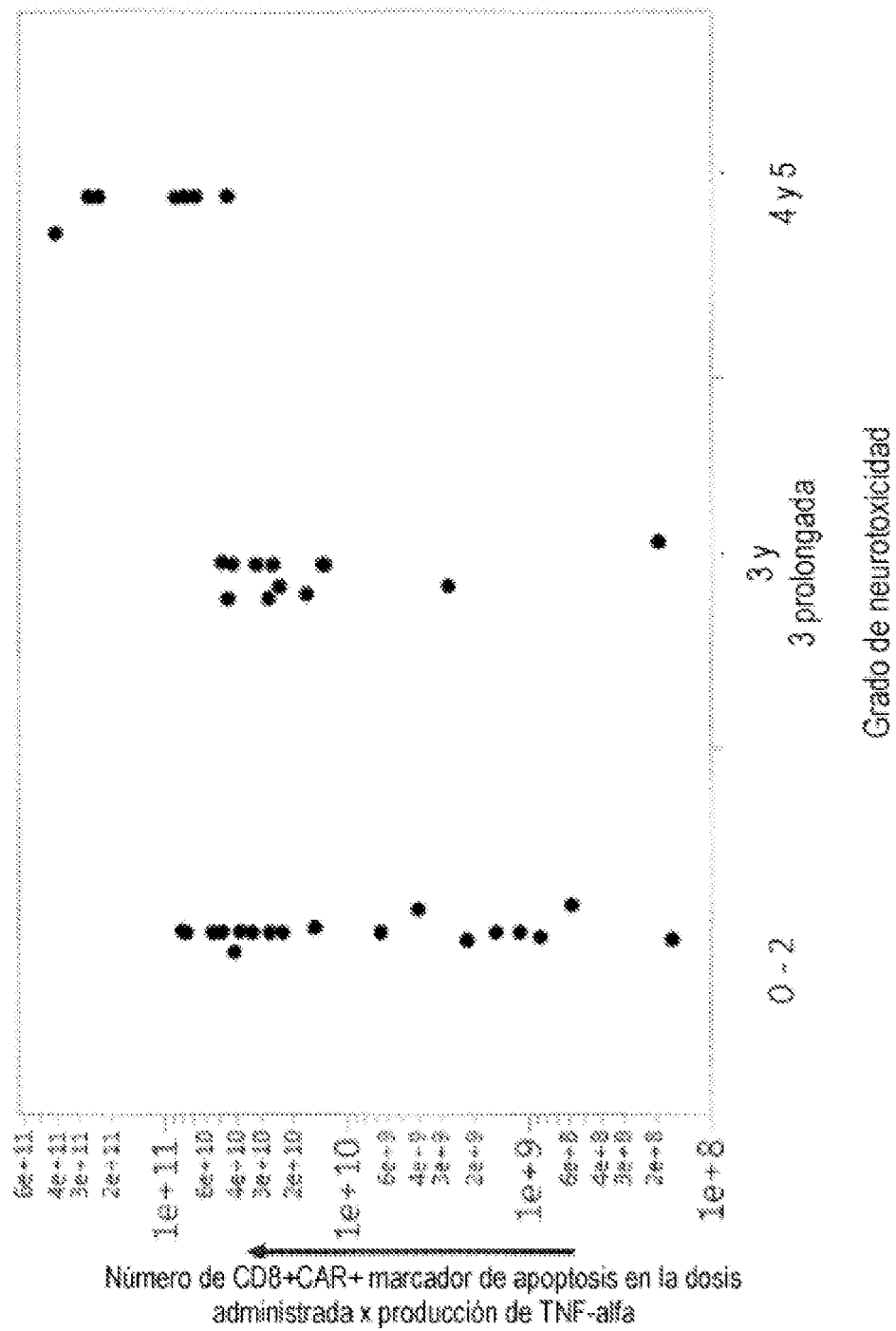


FIGURA 8

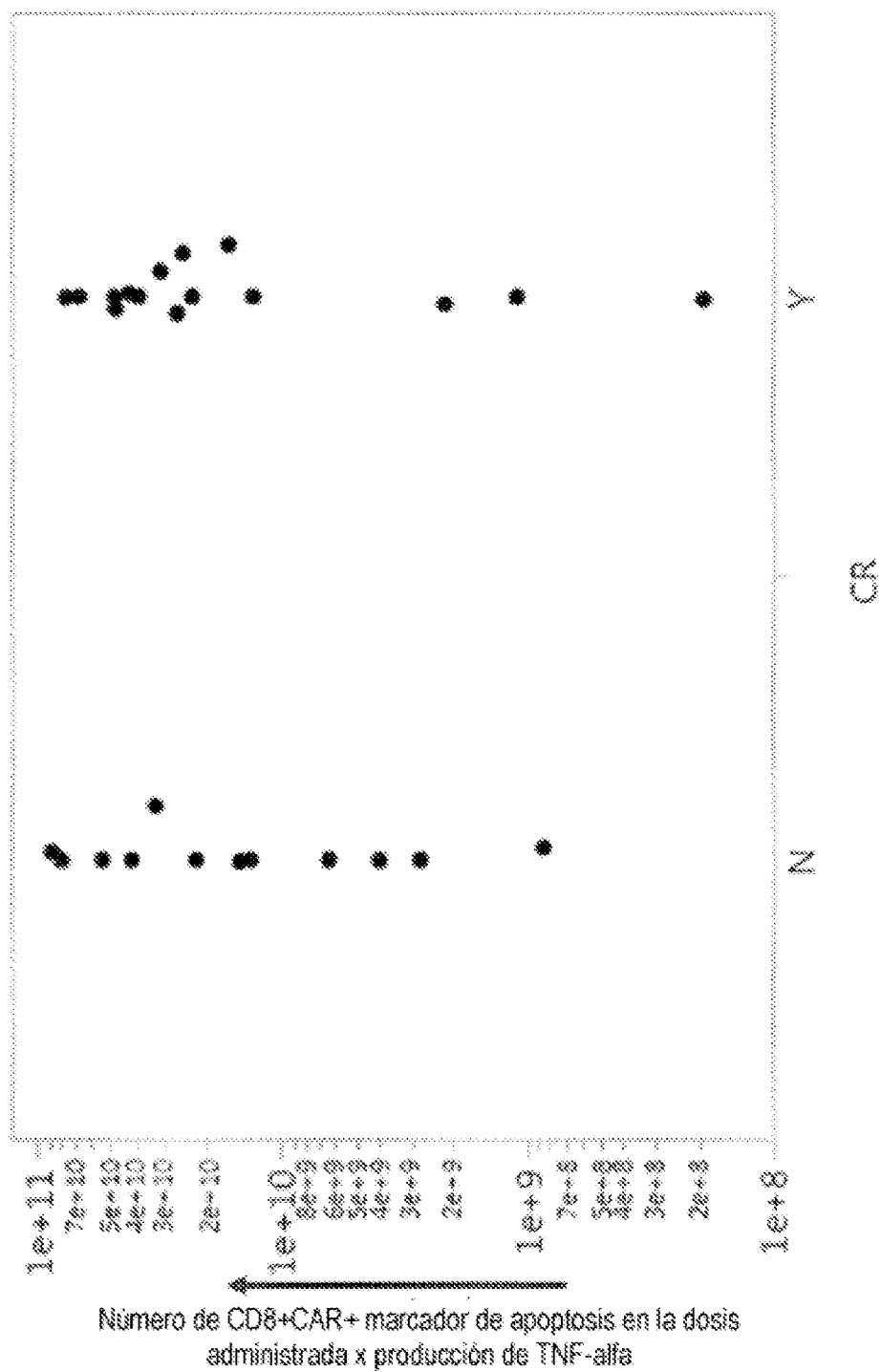


FIGURA 9

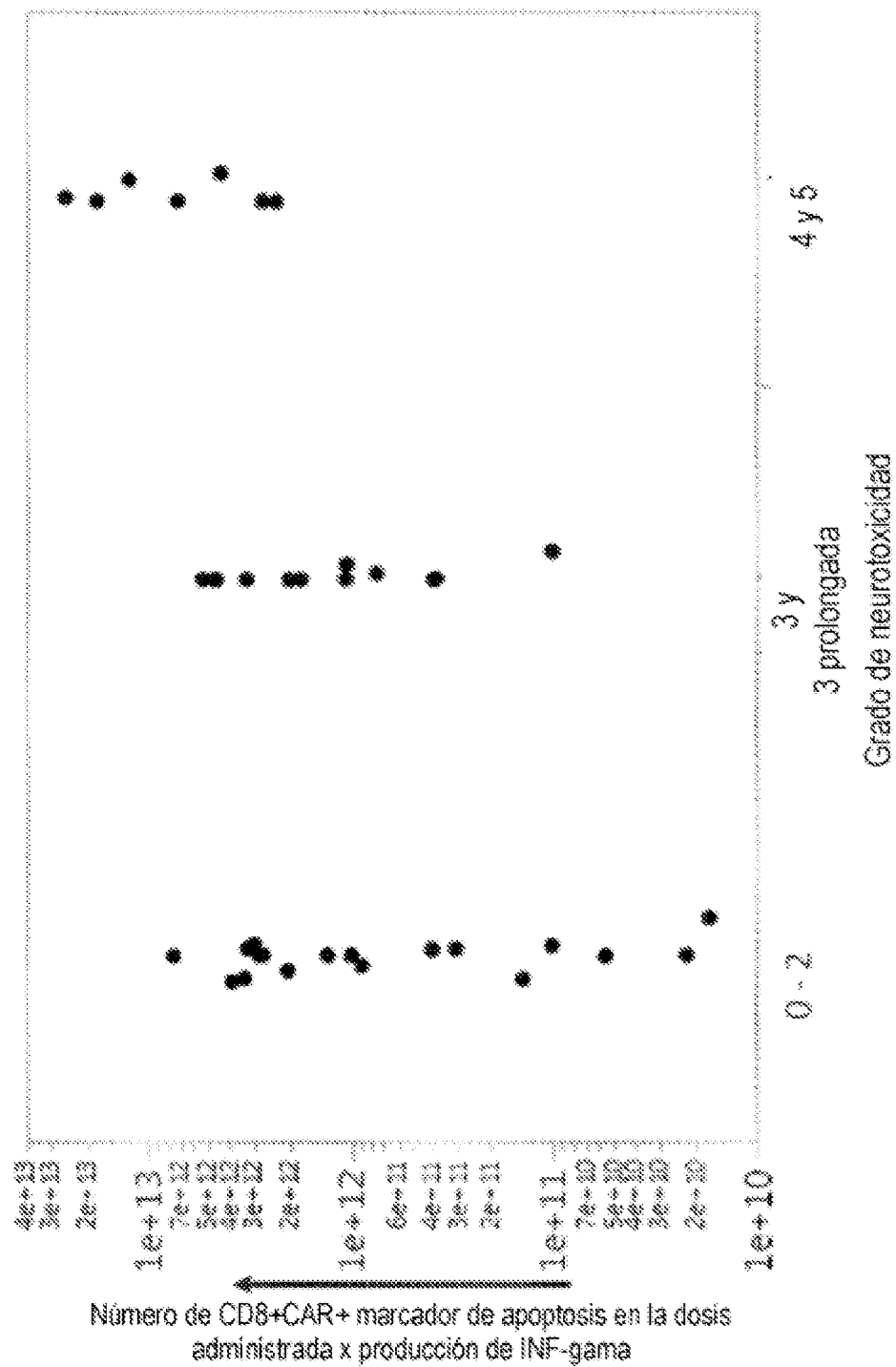


FIGURA 10

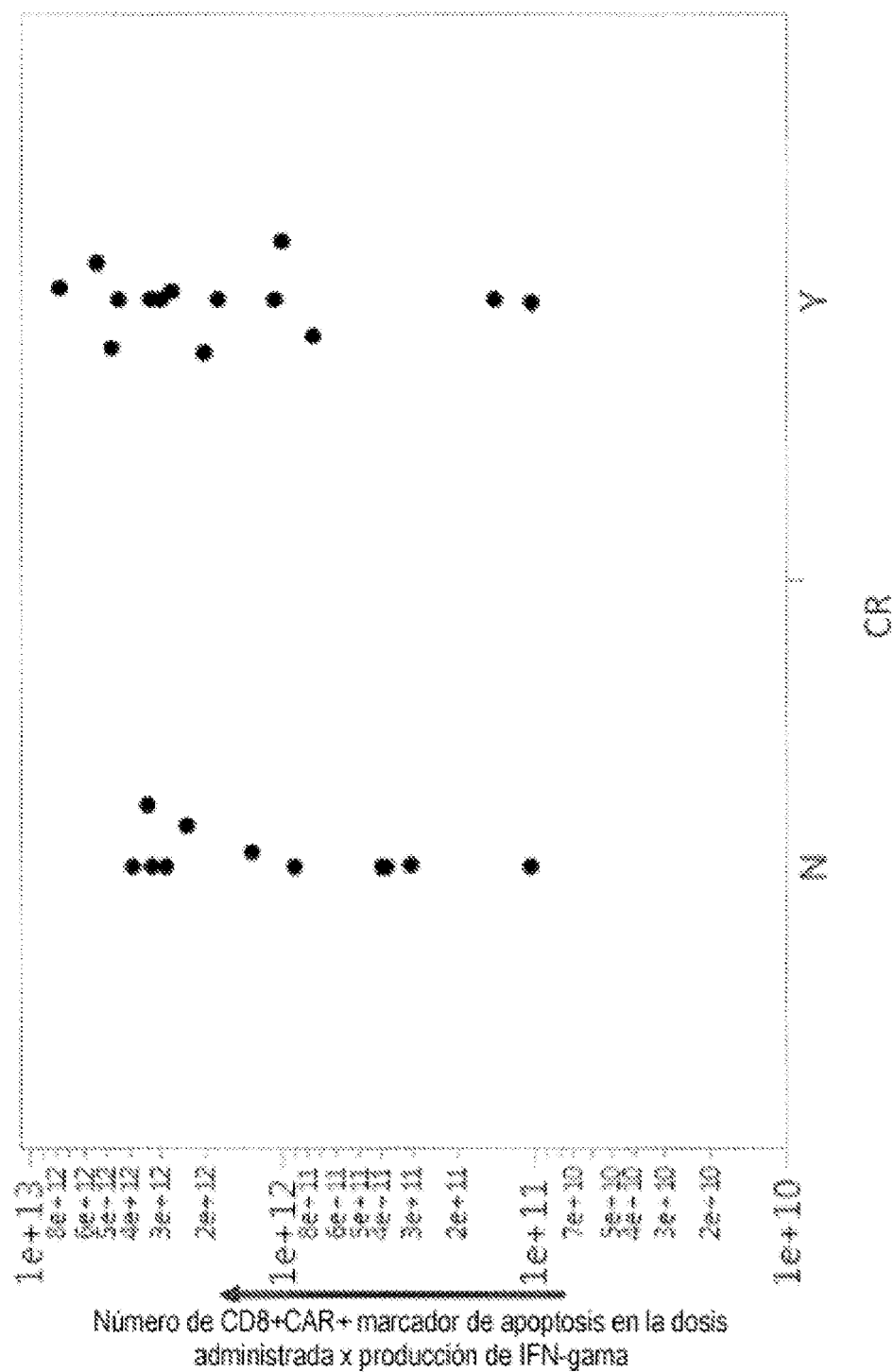


FIGURA 11

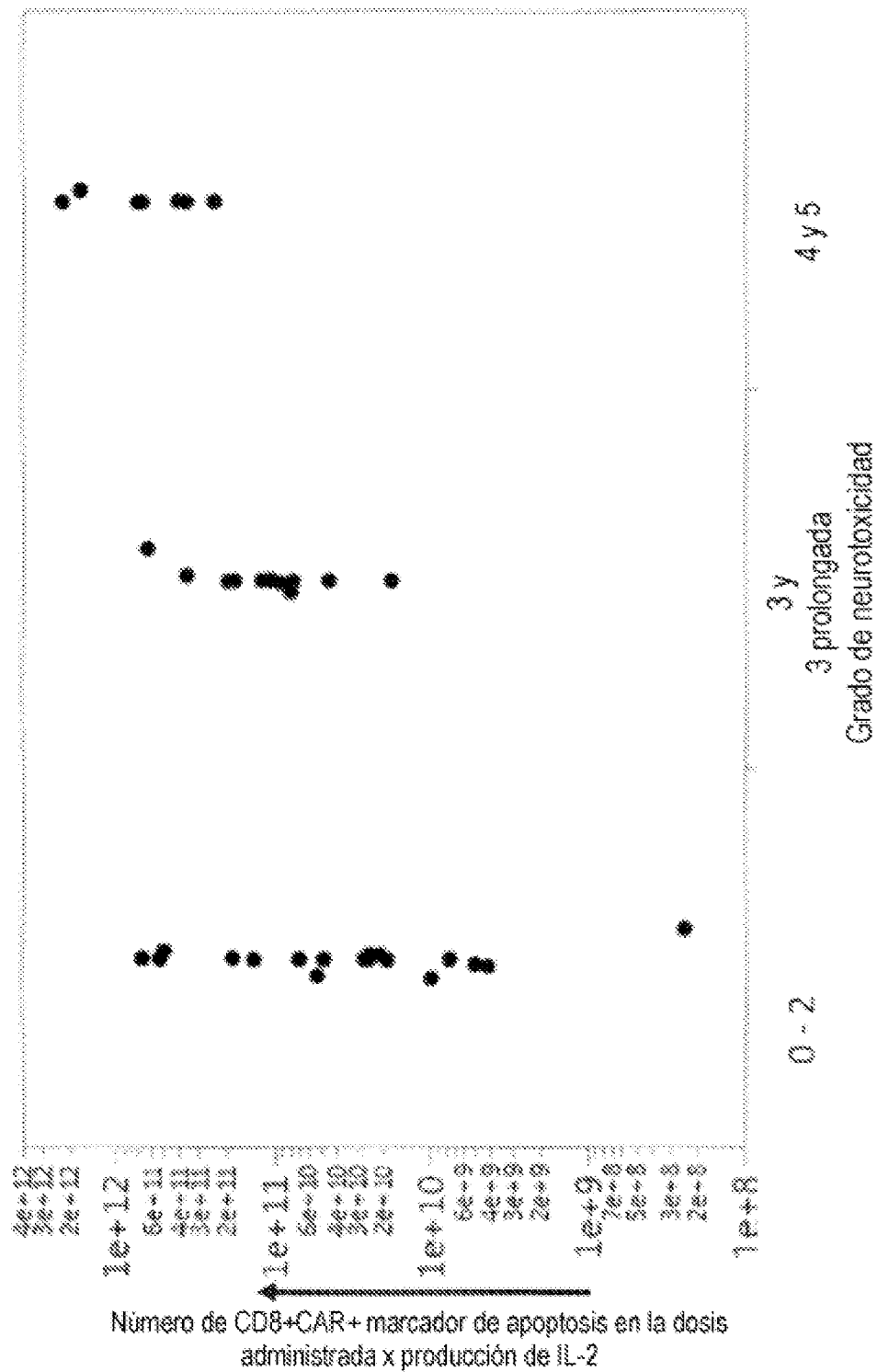


FIGURA 12

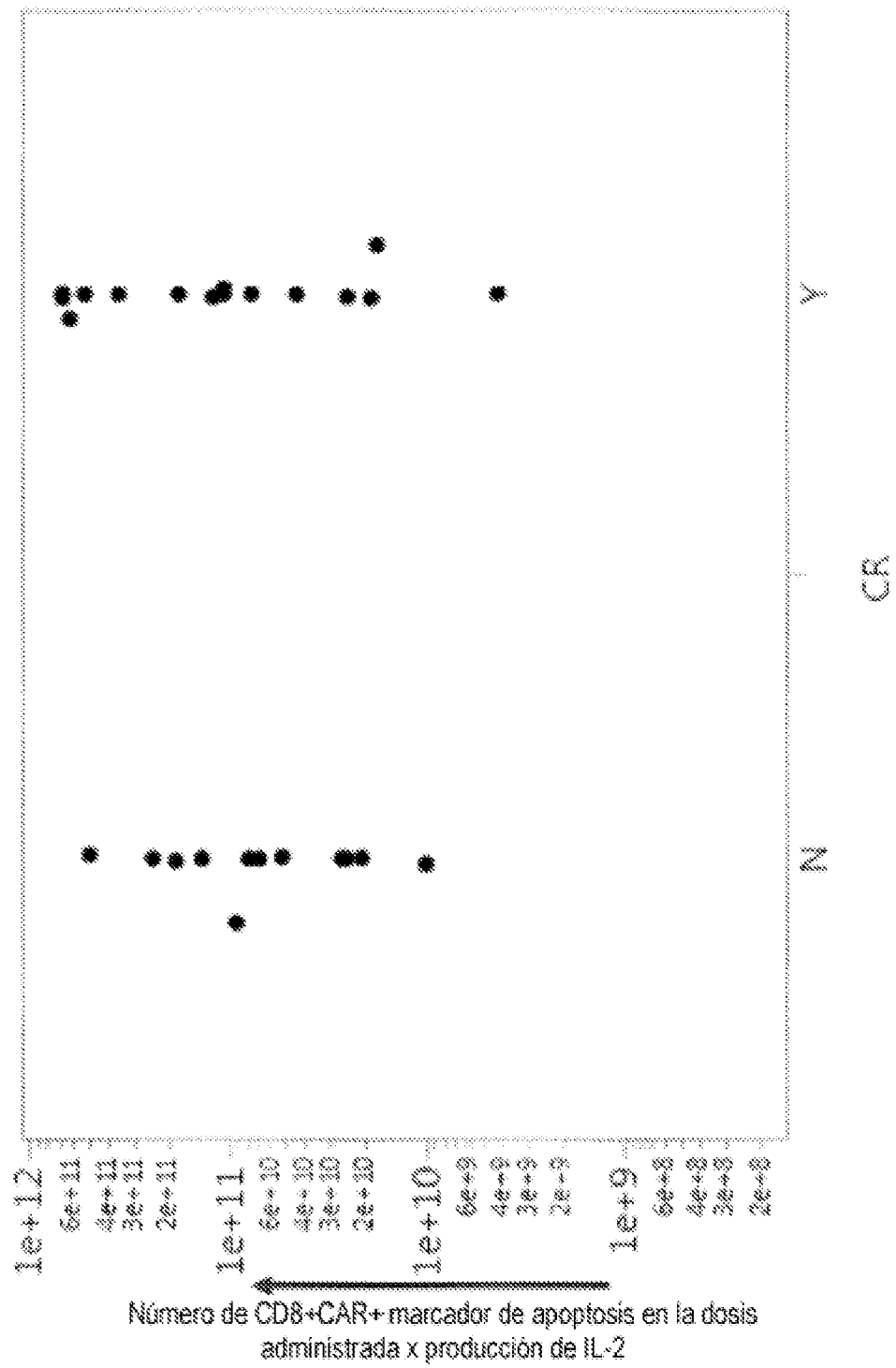


FIGURA 13

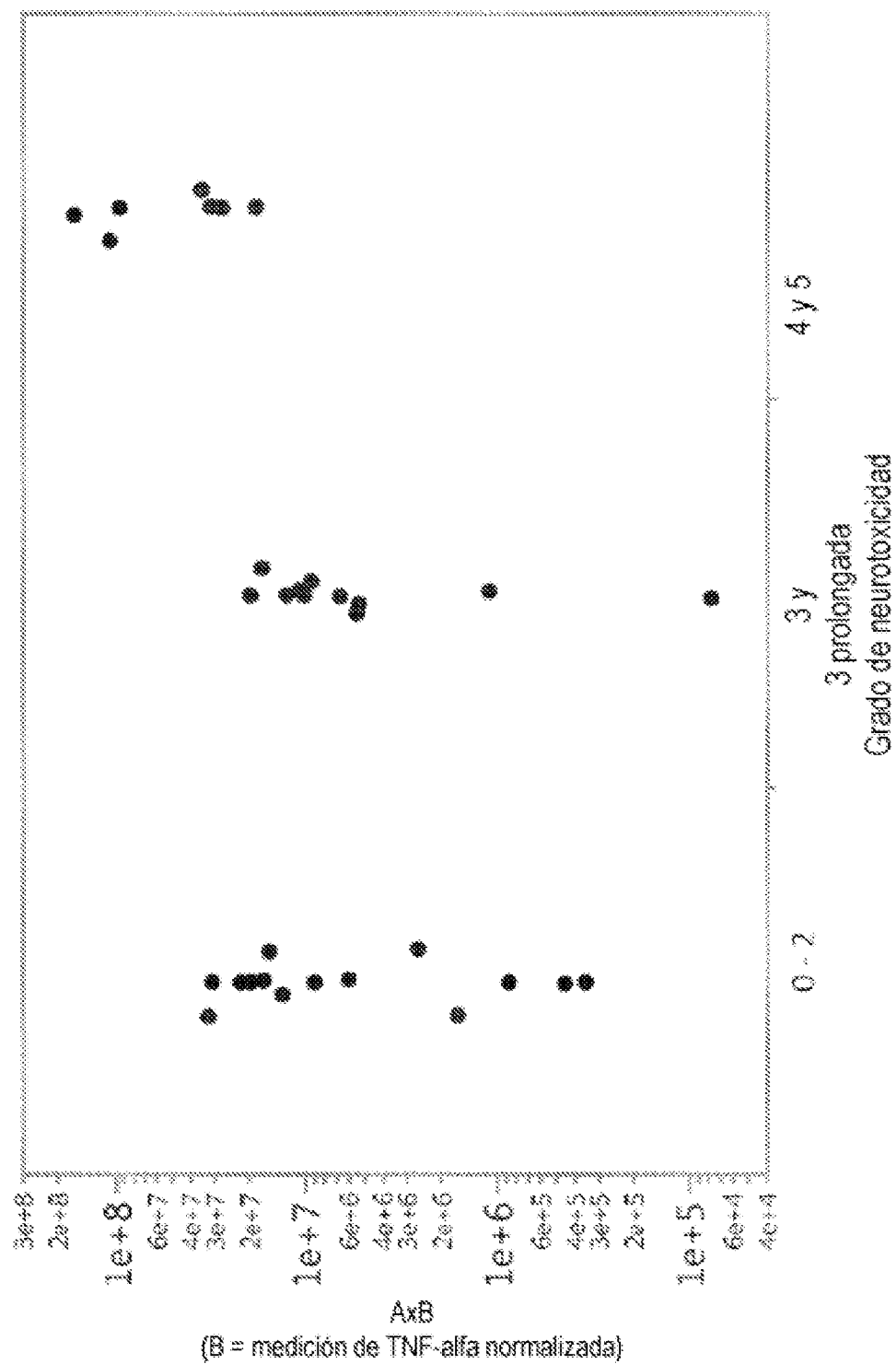


FIGURA 14A

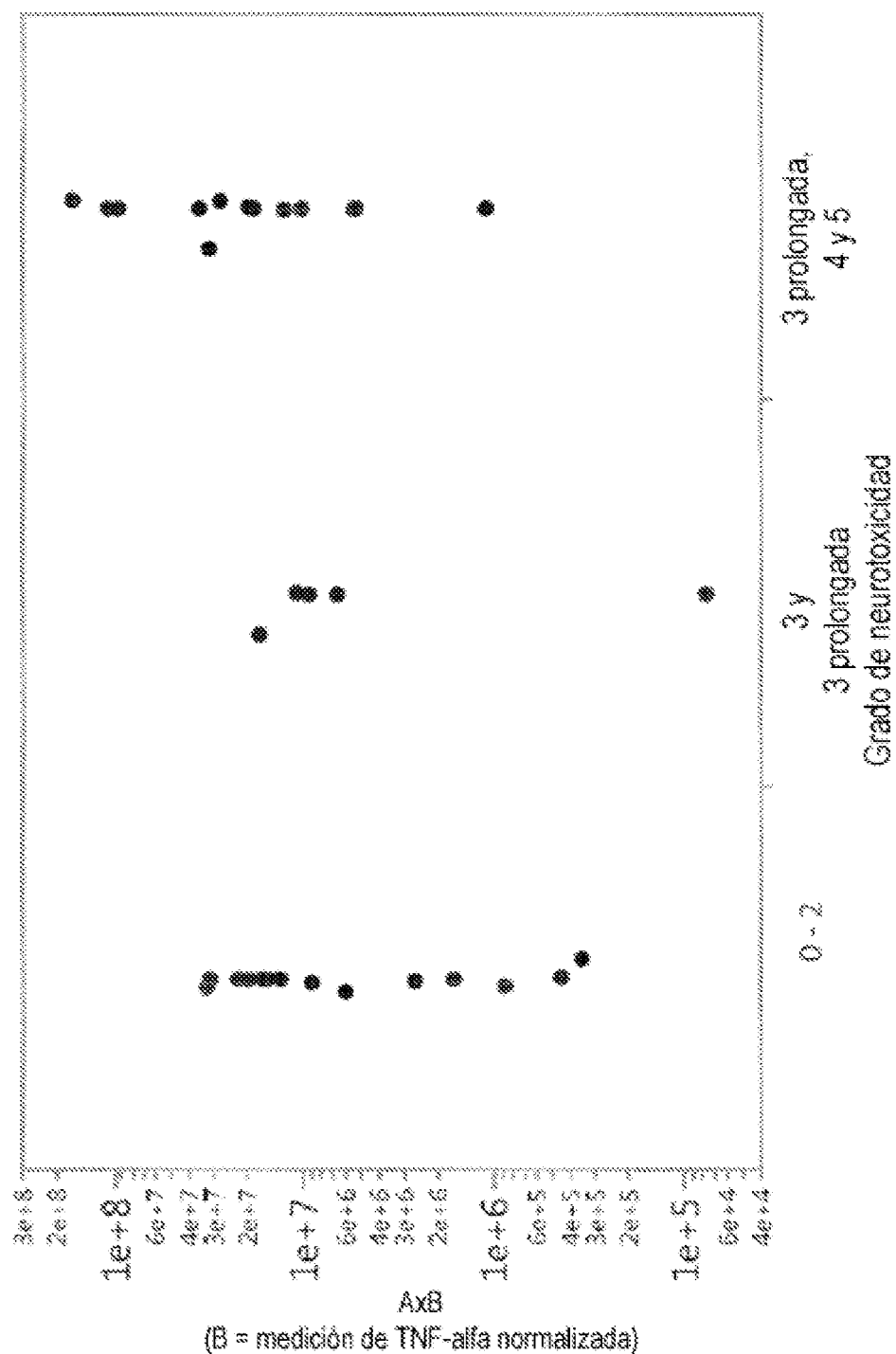


FIGURA 14A
(continuación)

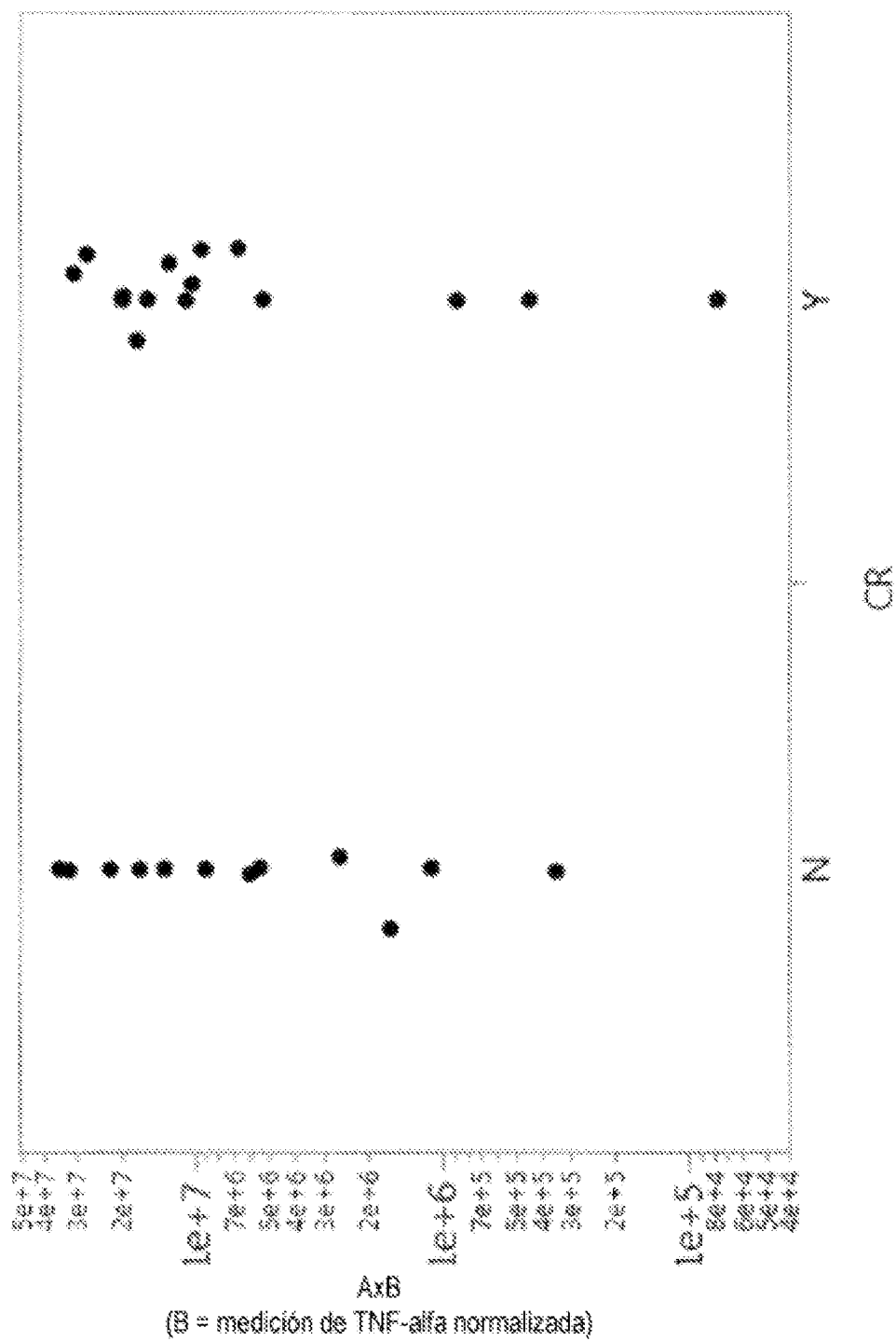


FIGURA 14B

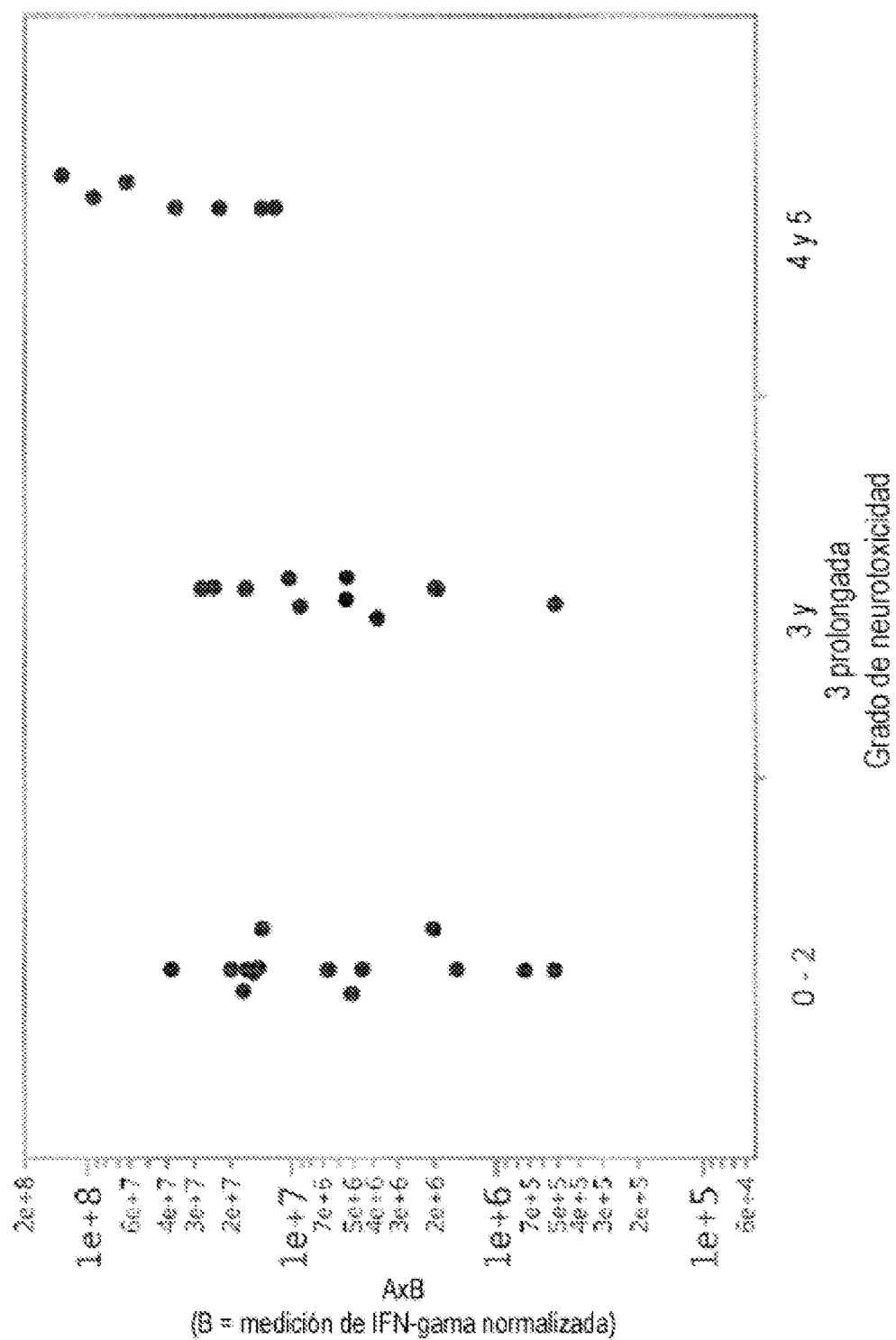


FIGURA 15A

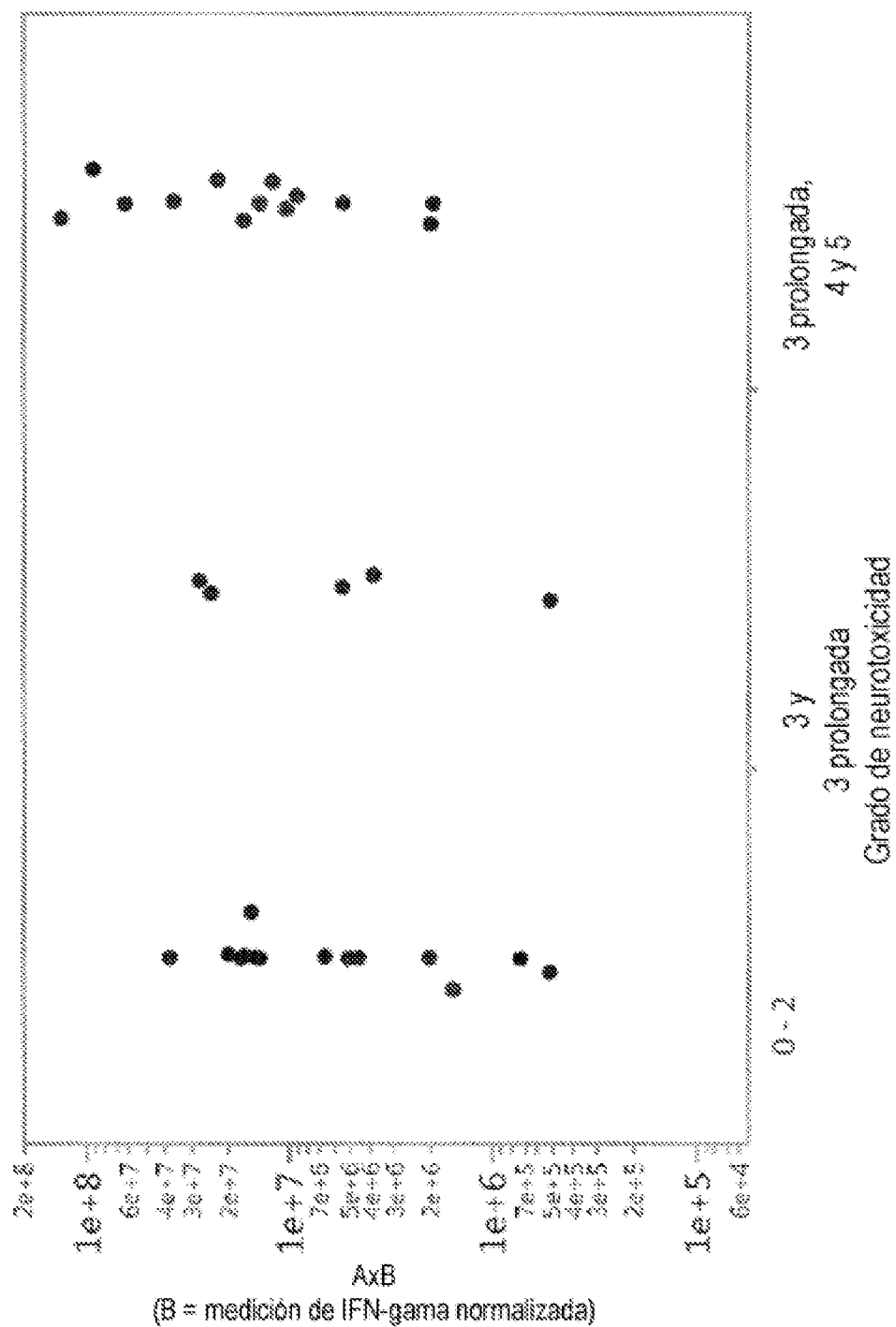


FIGURA 15A
(continuación)

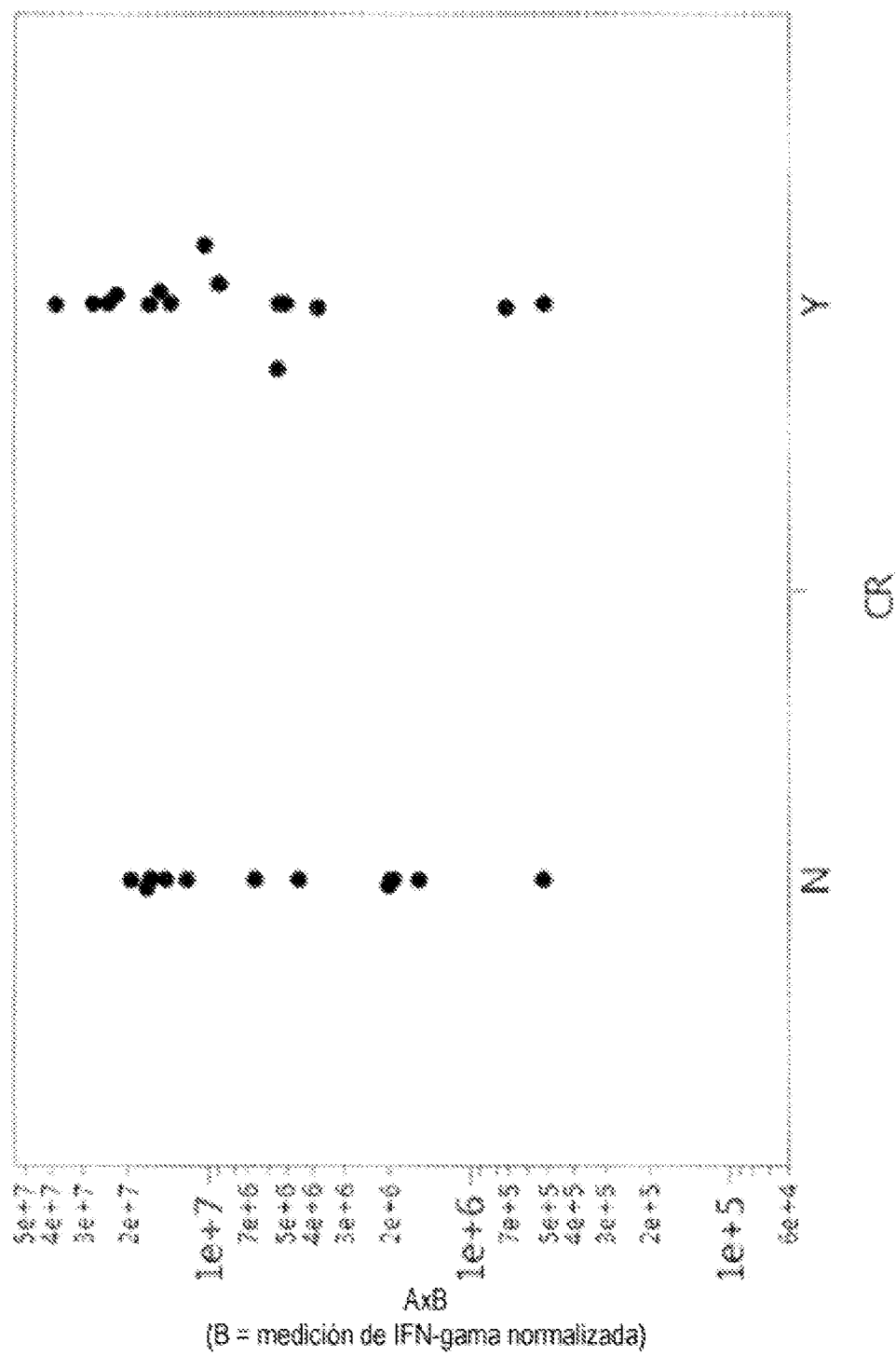


FIGURA 15B

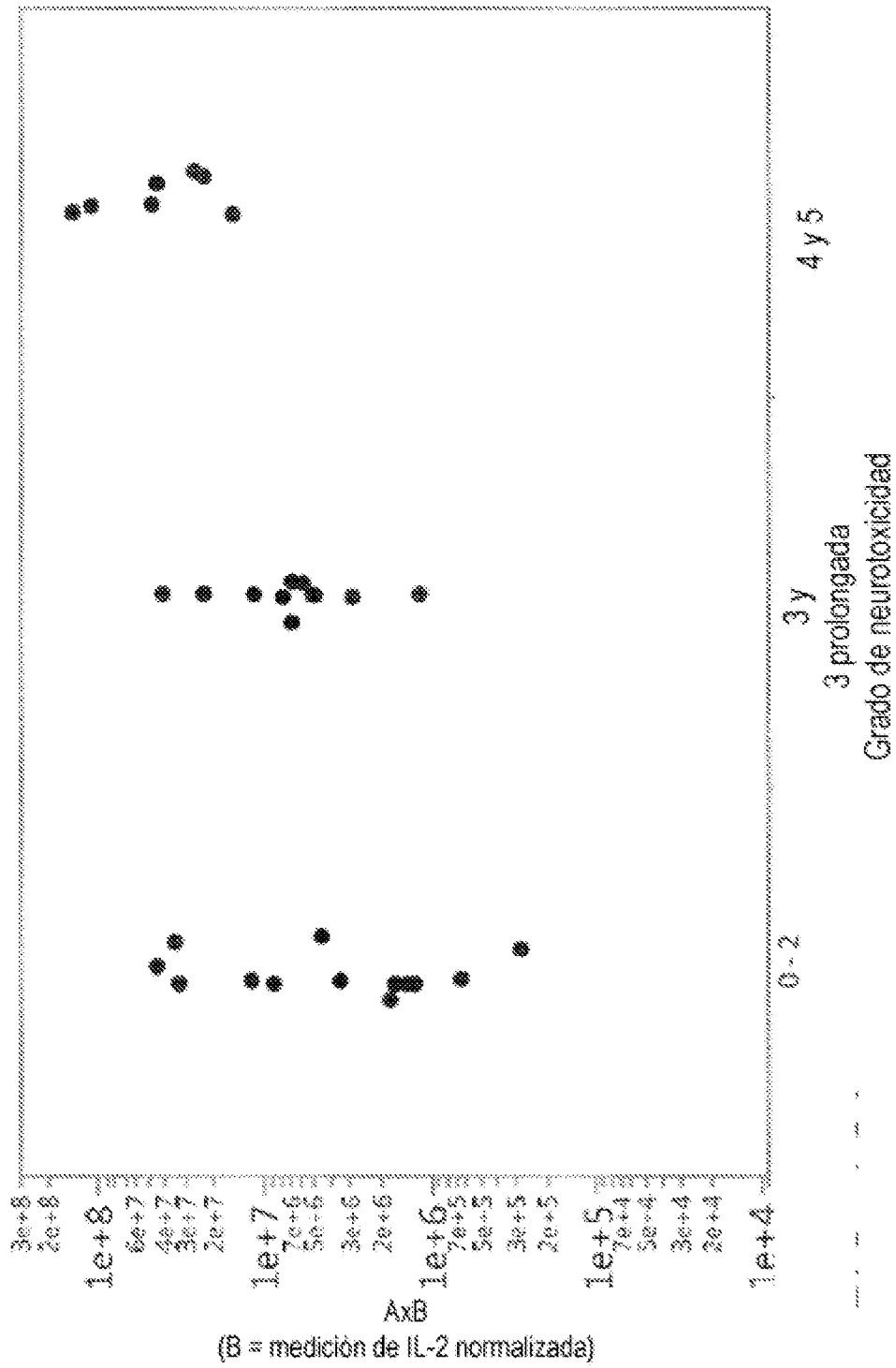


FIGURA 16A

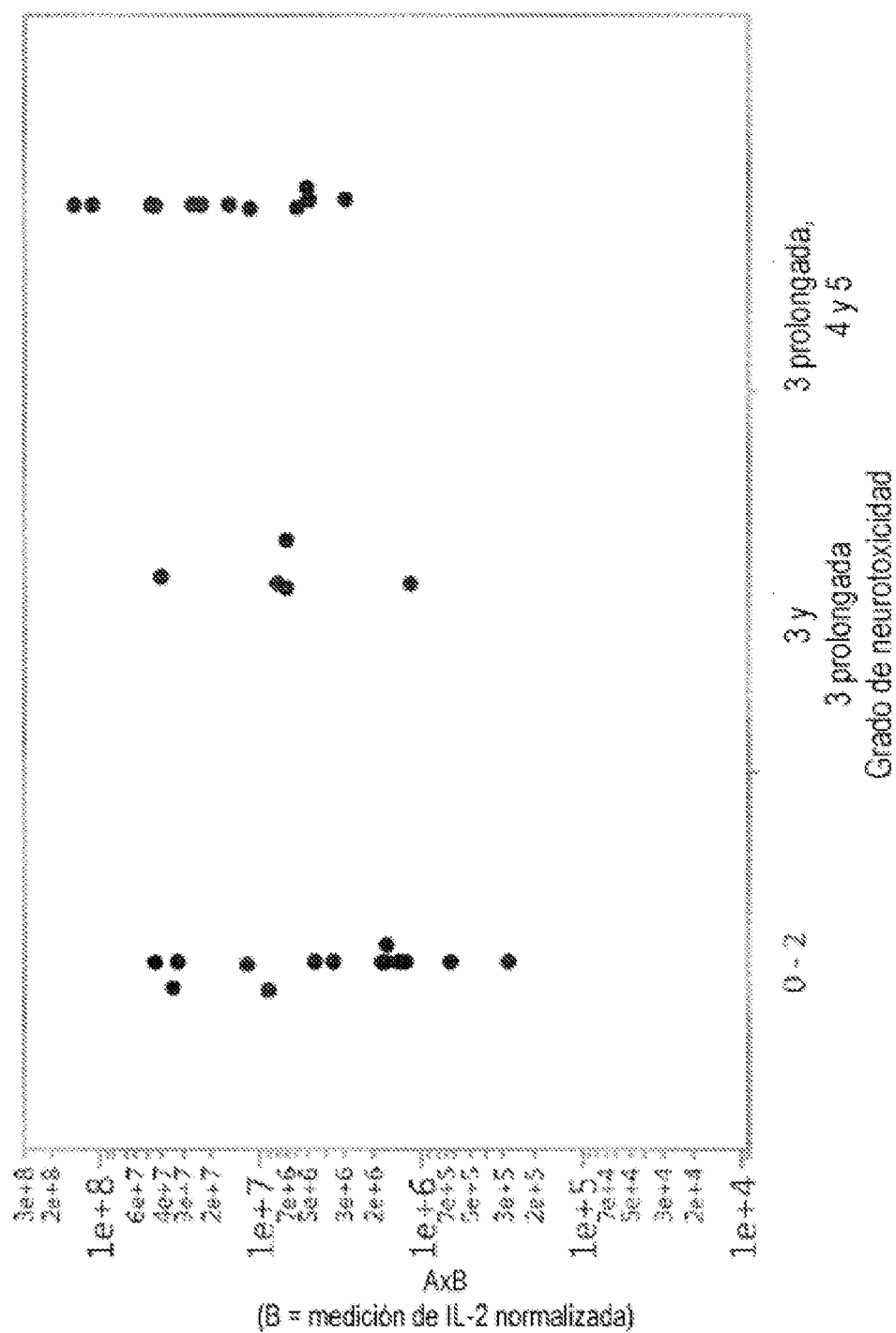


FIGURA 16A
(continuación)

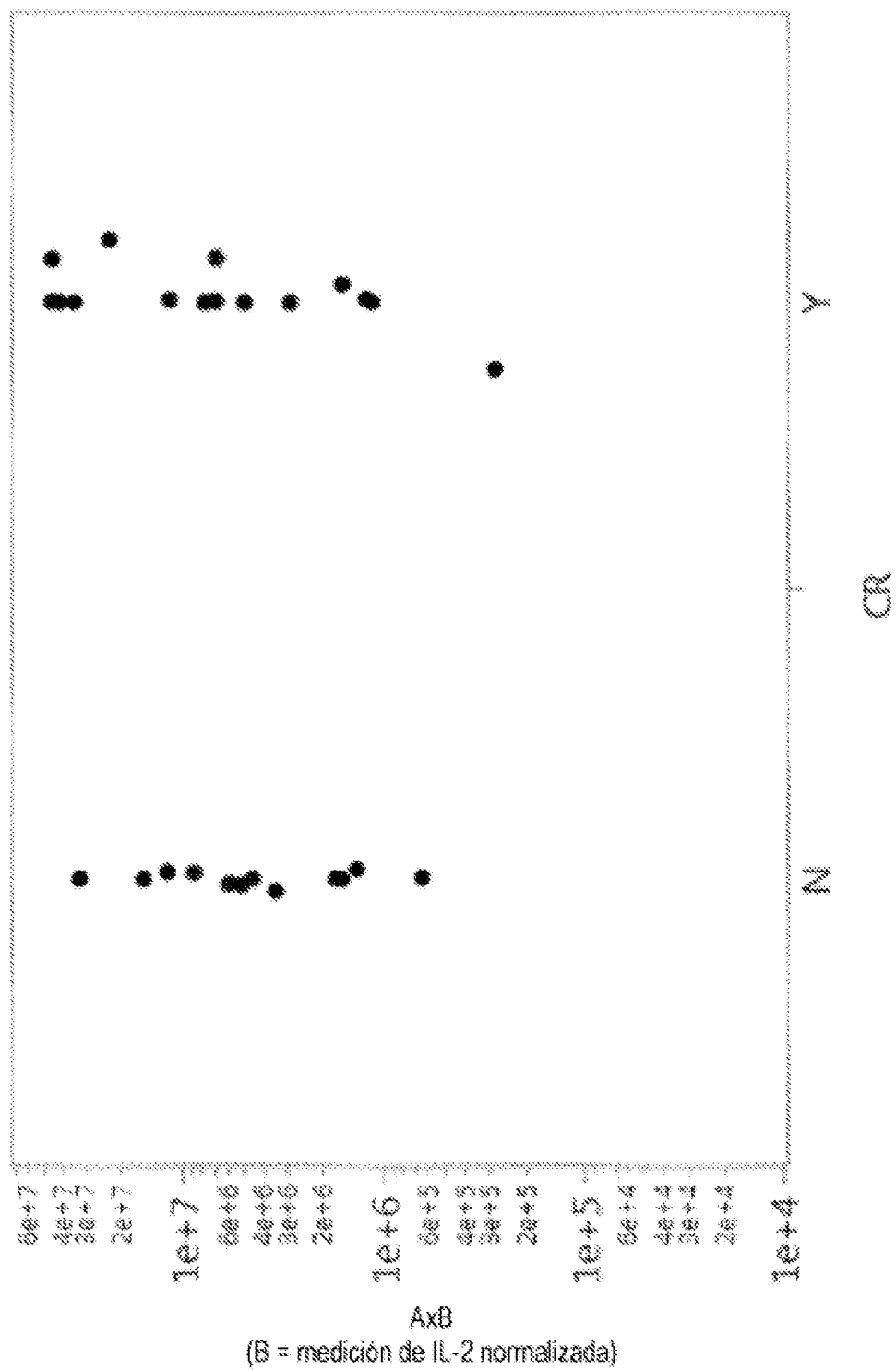


FIGURA 16B



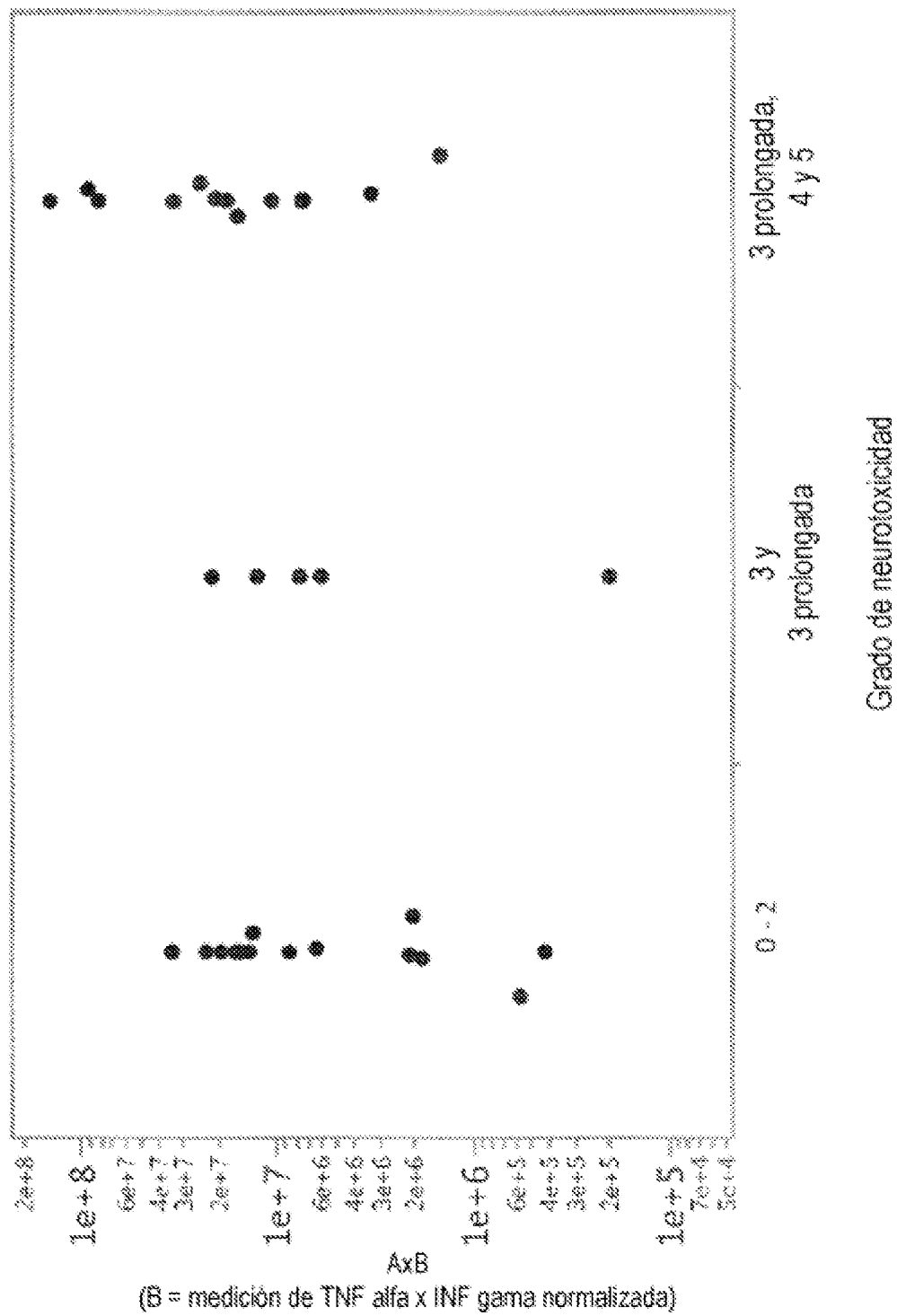


FIGURA 17A
(continuación)

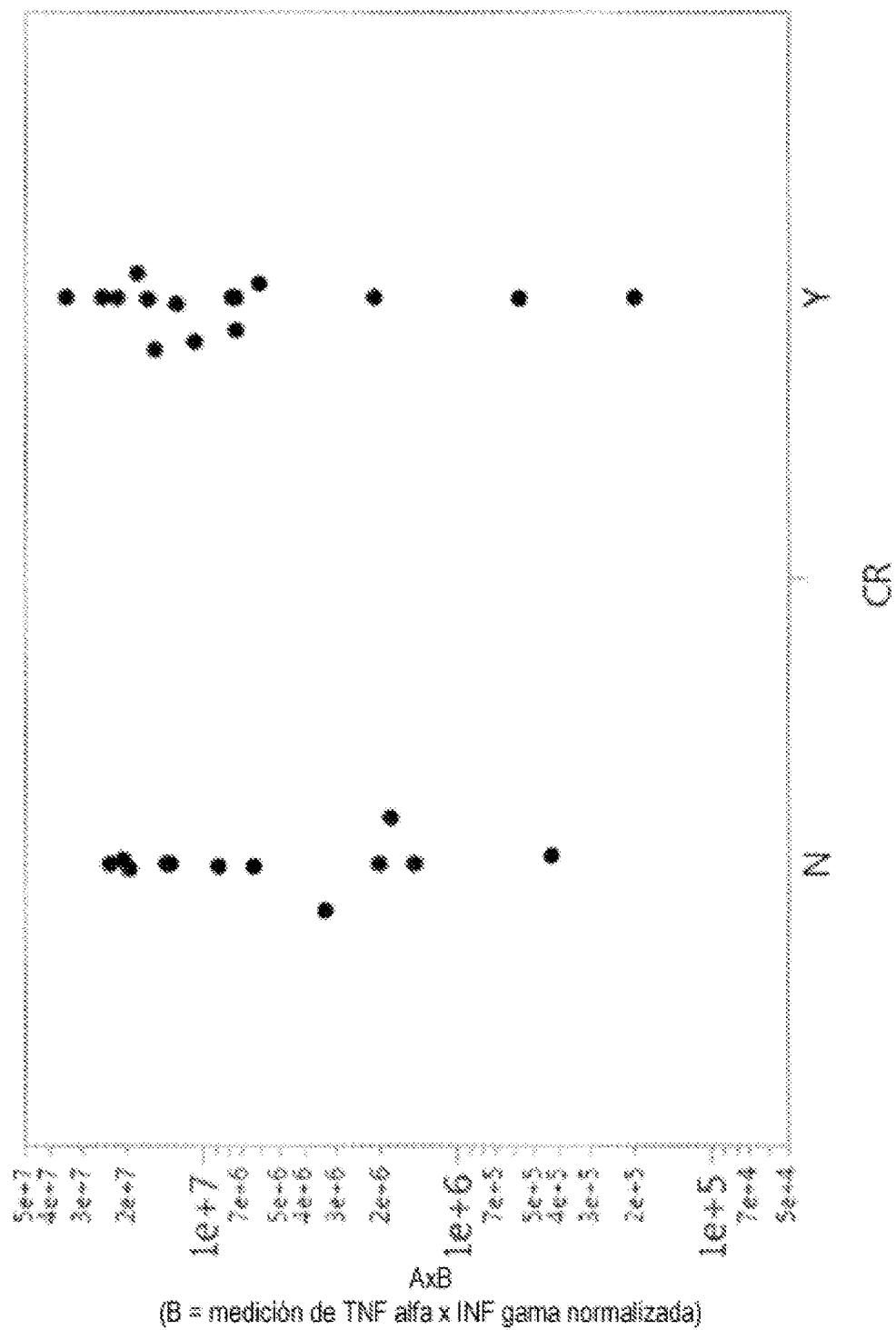


FIGURA 17B

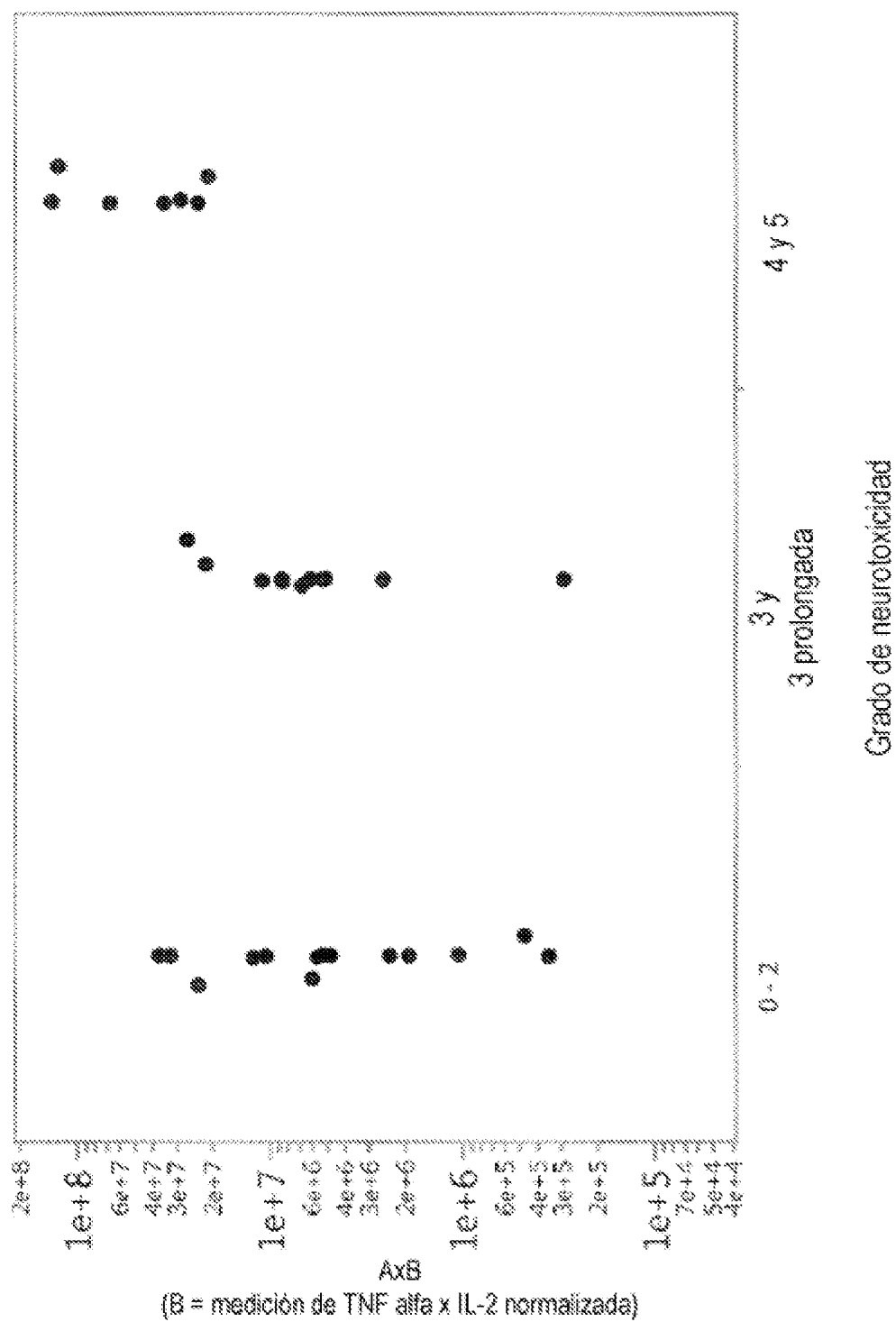


FIGURA 18A



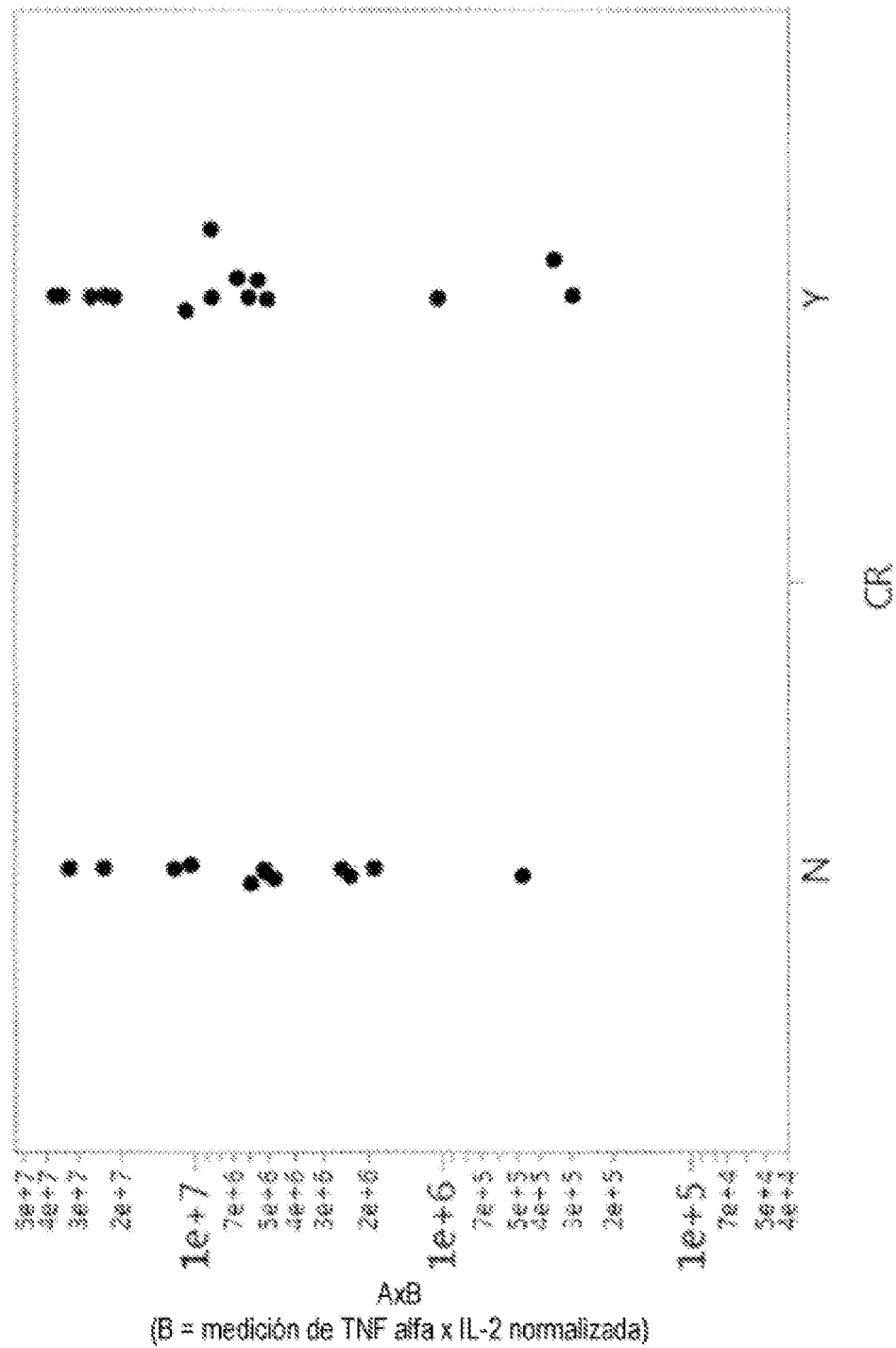


FIGURA 18B

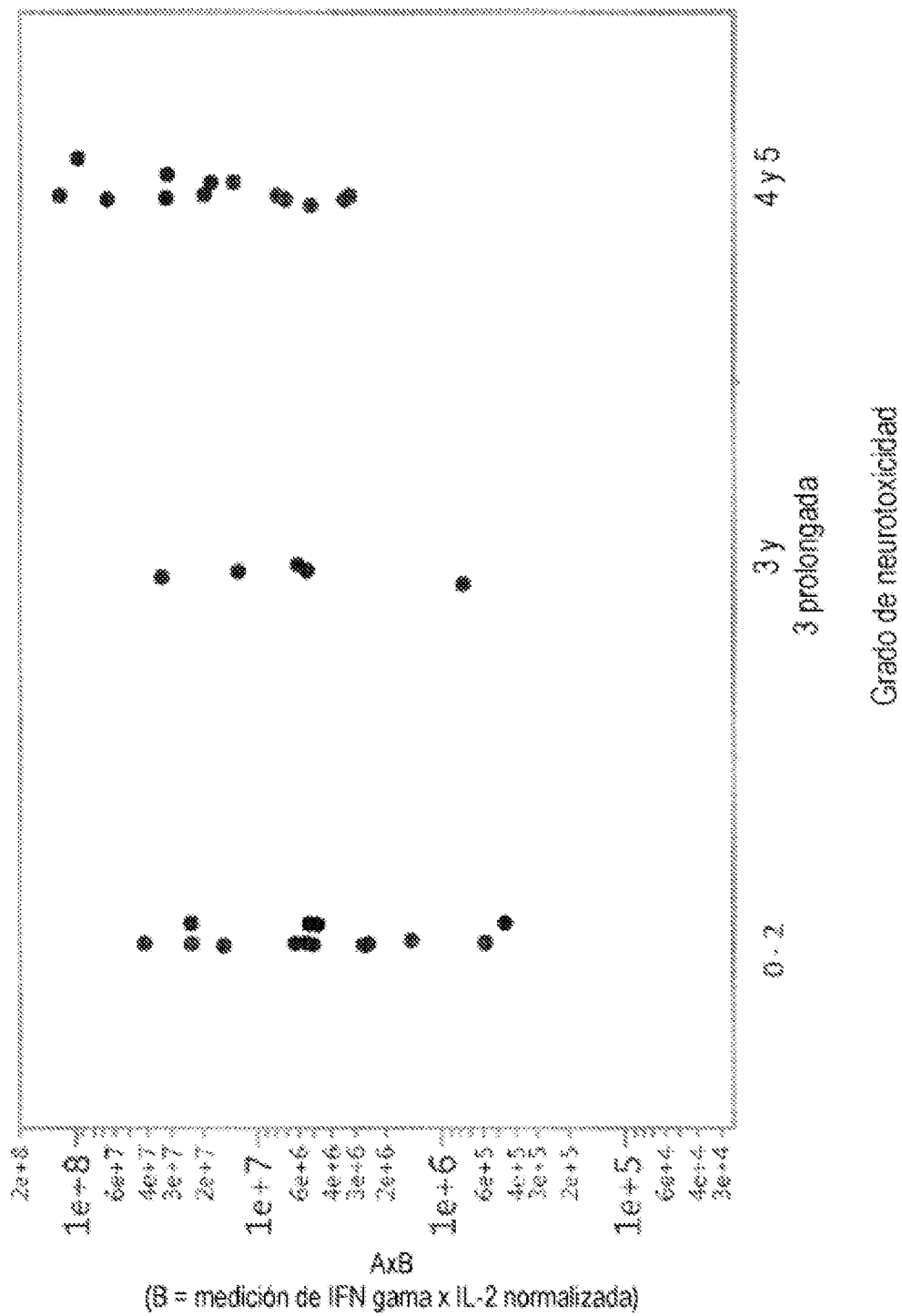


FIGURA 19A

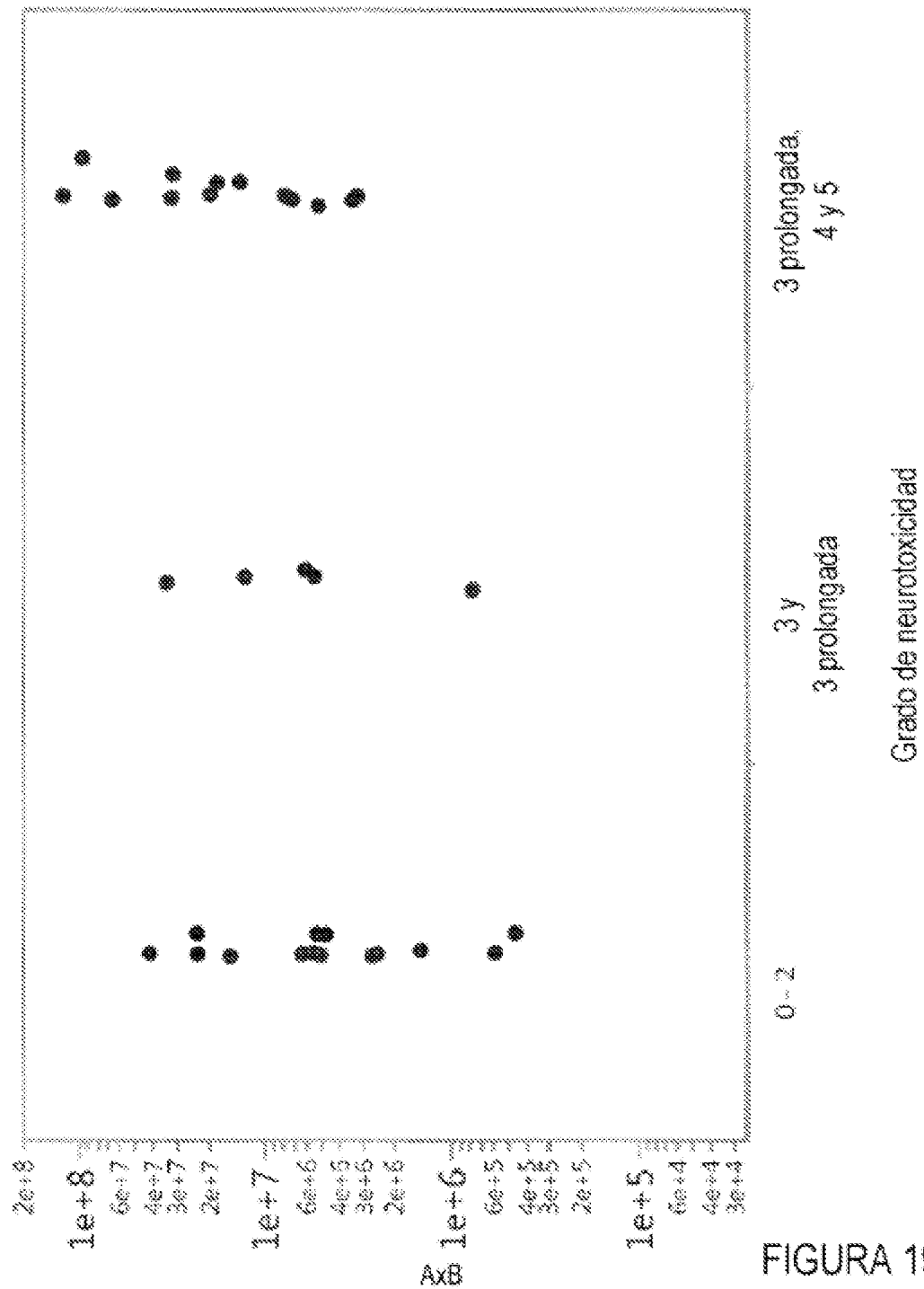


FIGURA 19A
(continuación)

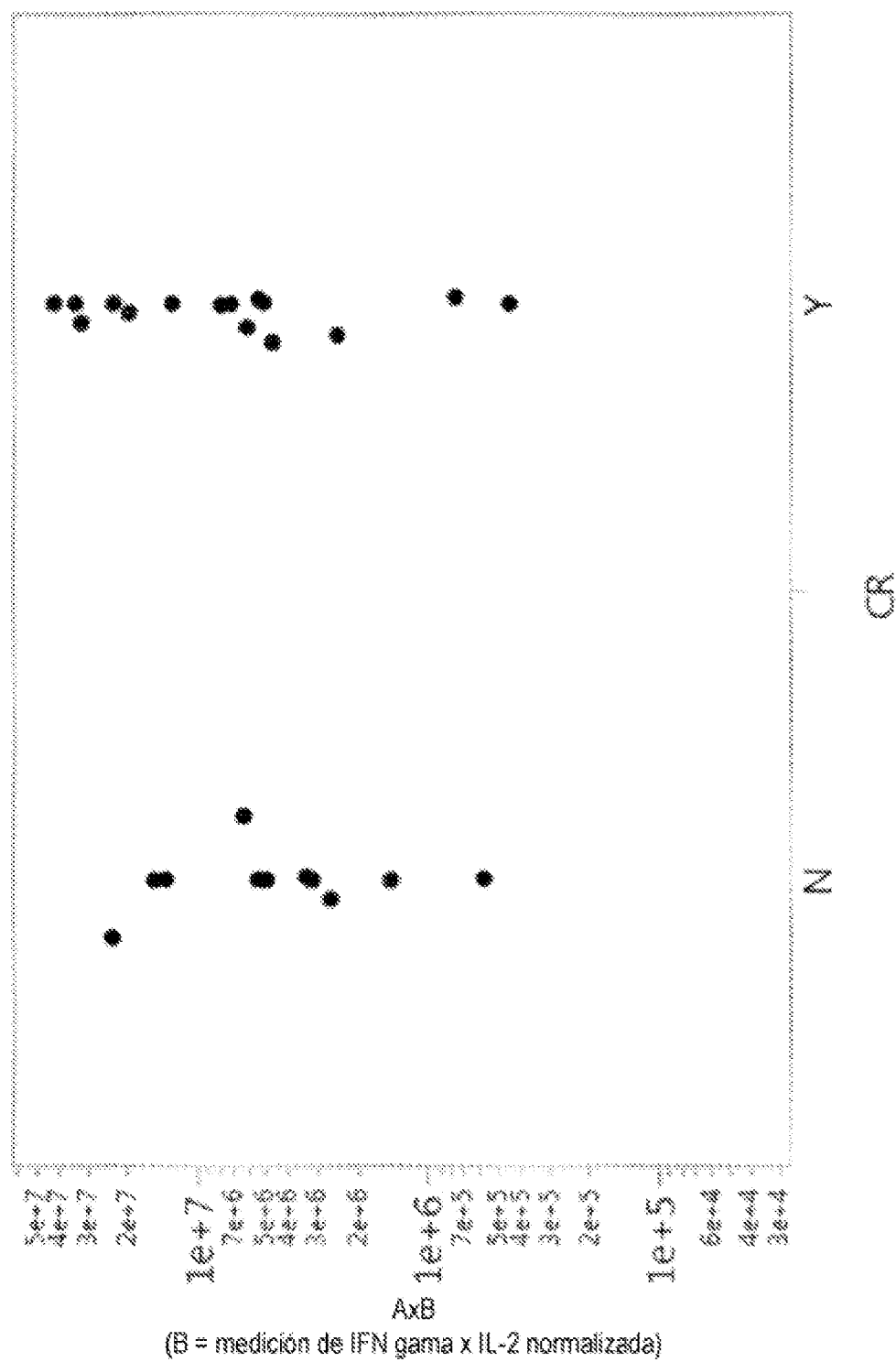


FIGURA 19B

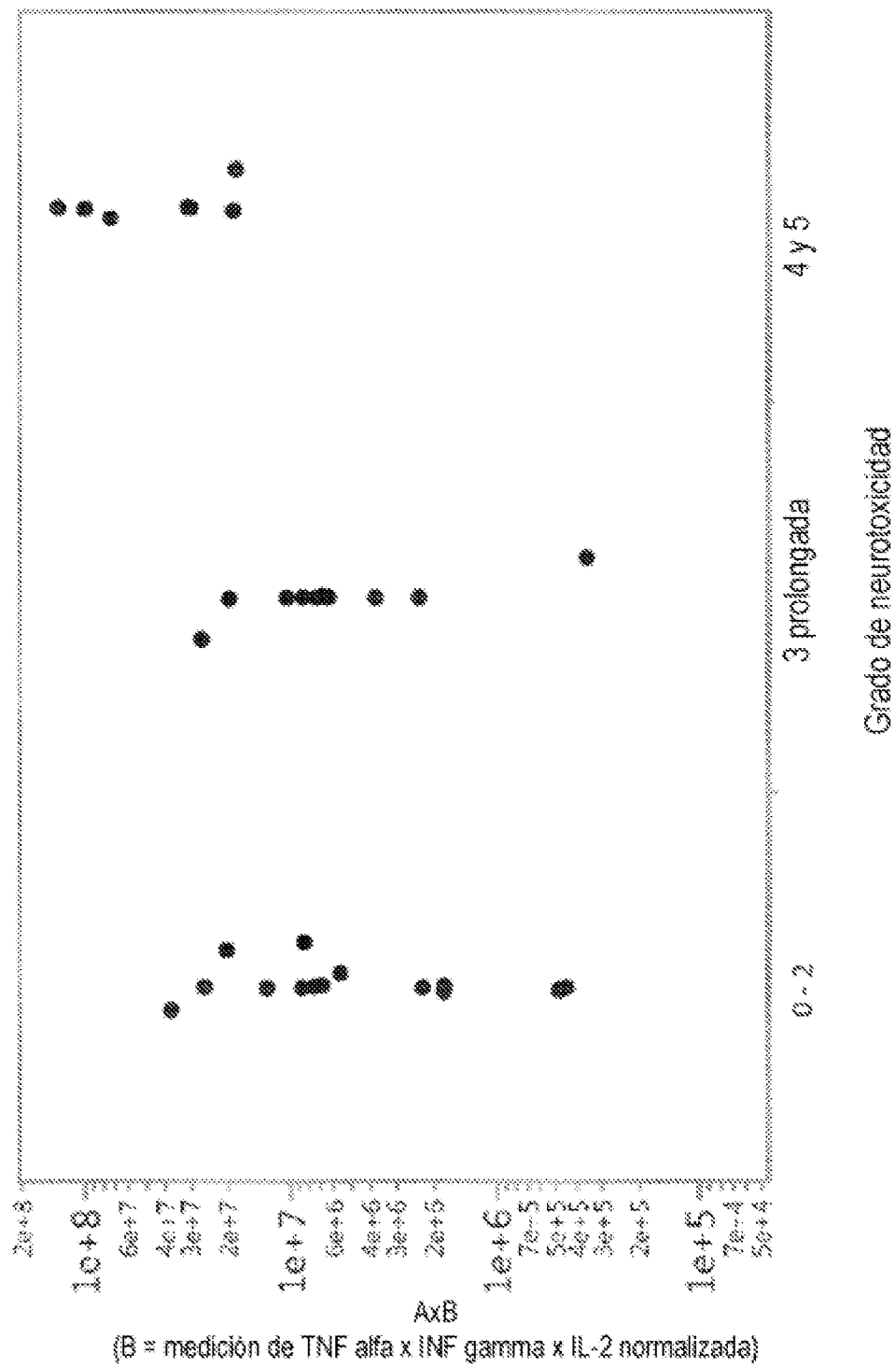


FIGURA 20A

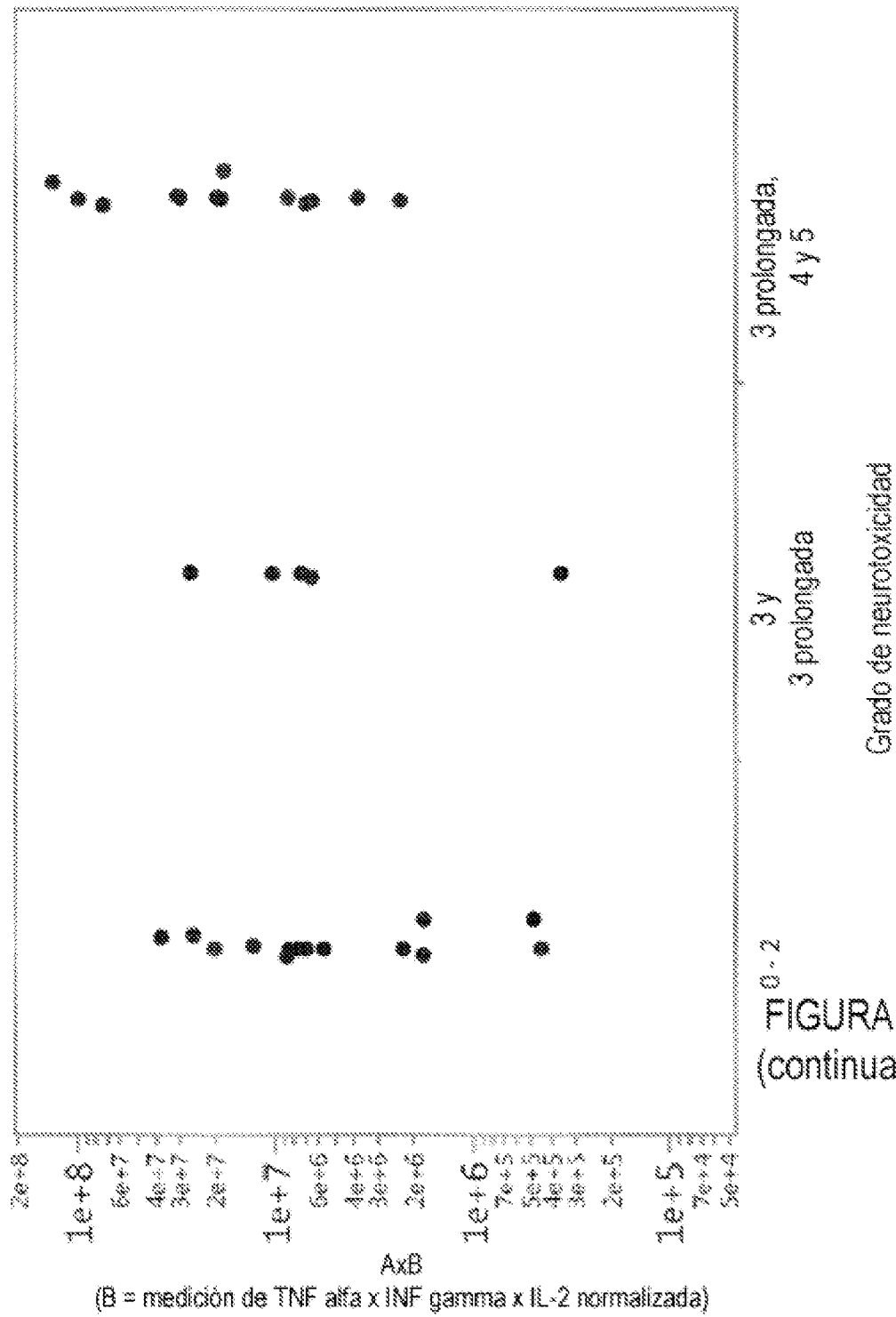
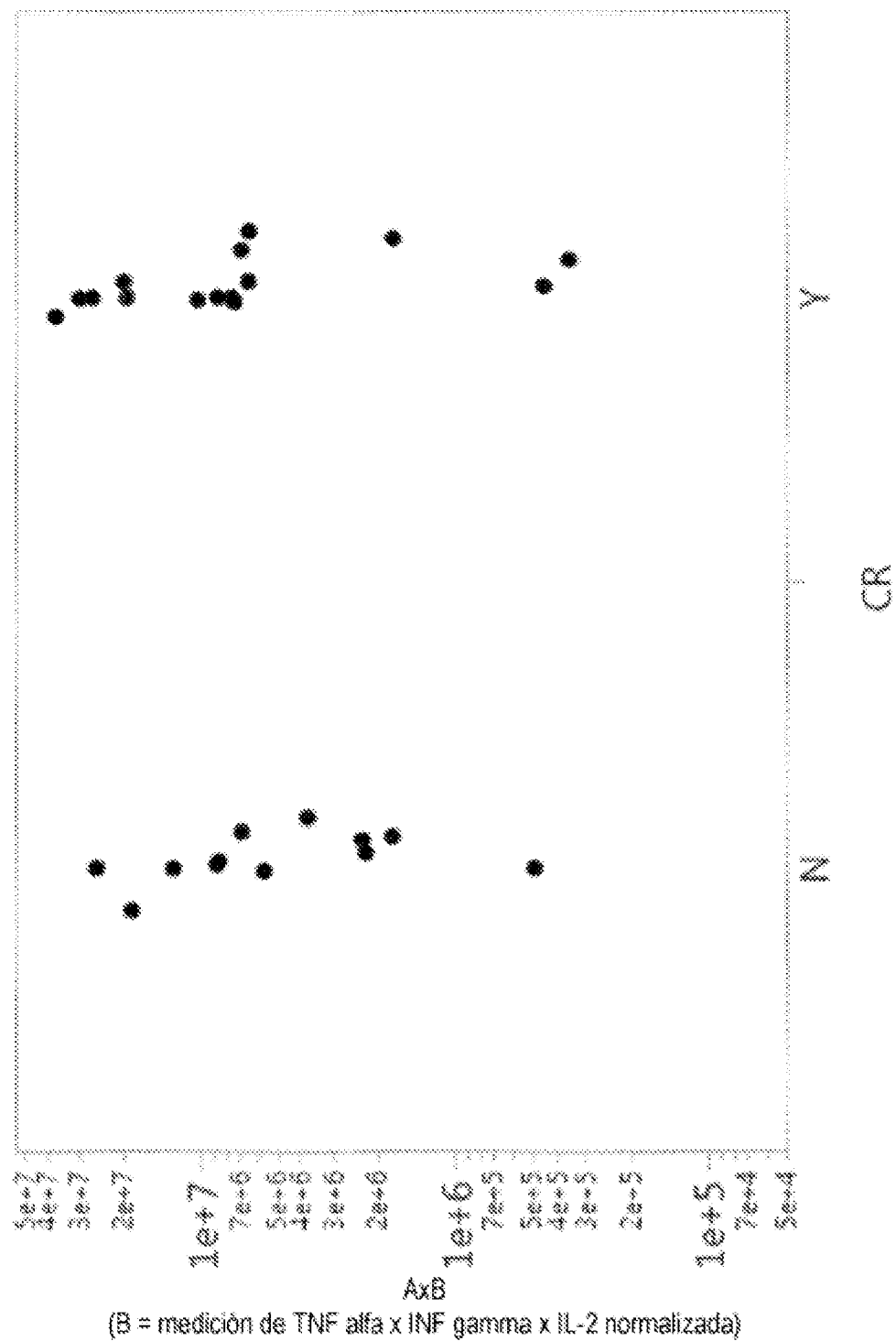


FIGURA 20A
(continuación)



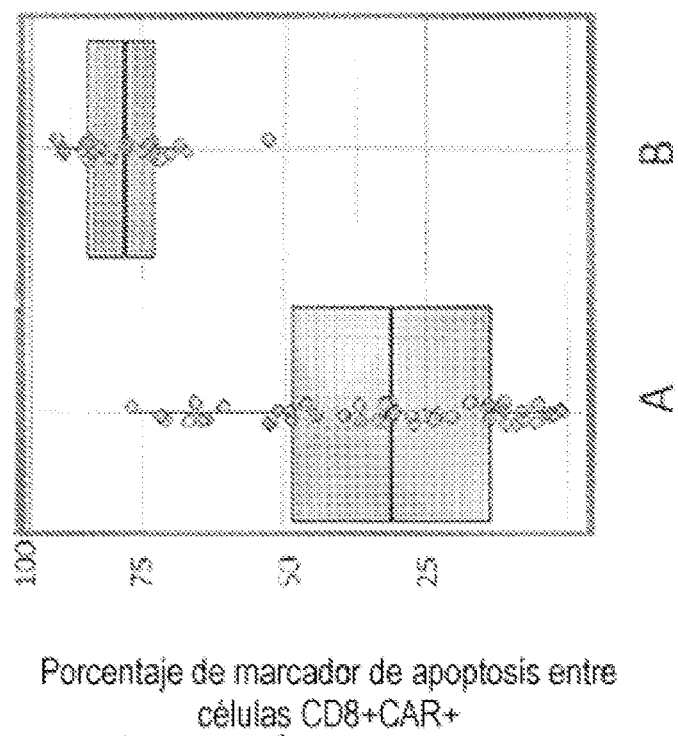


FIGURA 21A

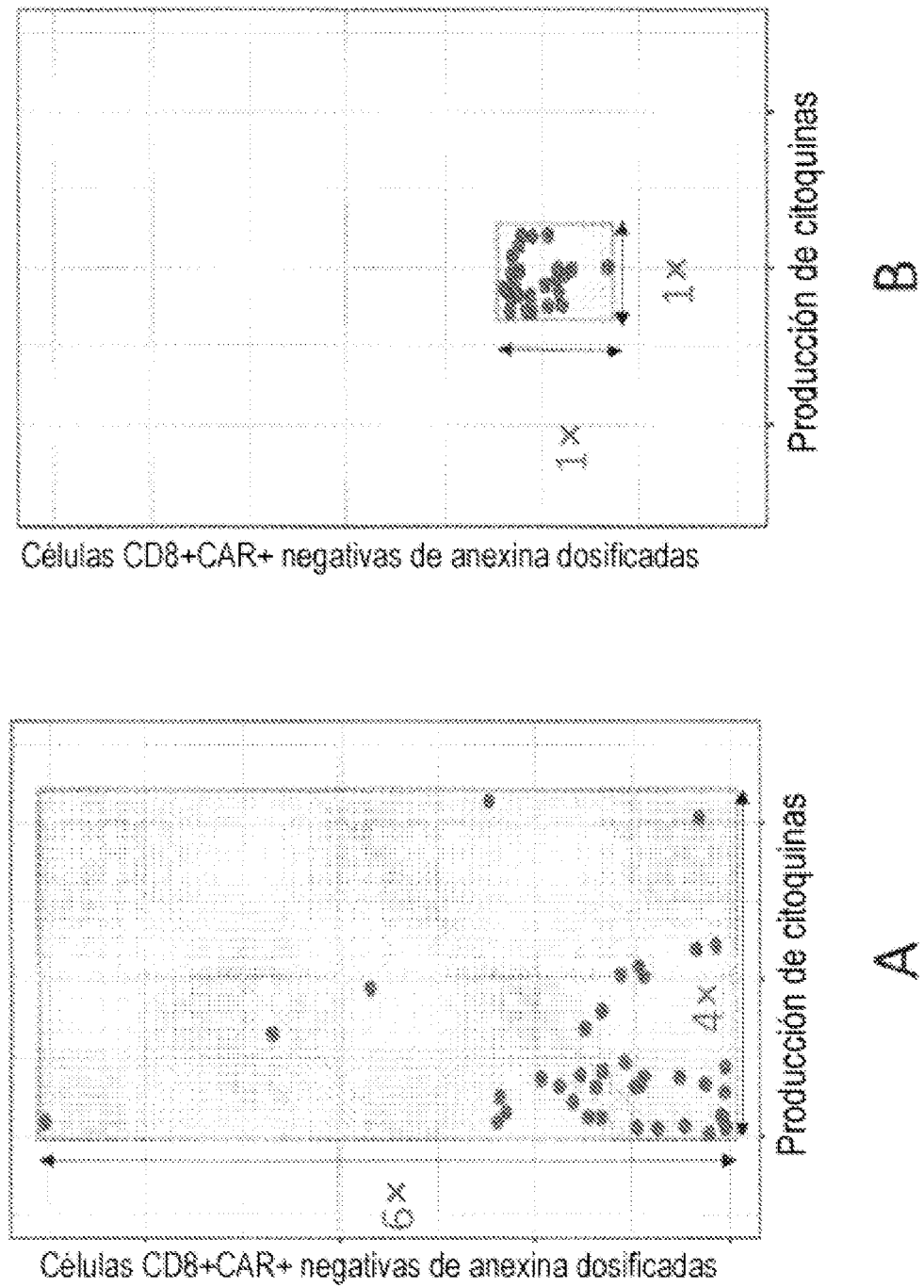


FIGURA 21B

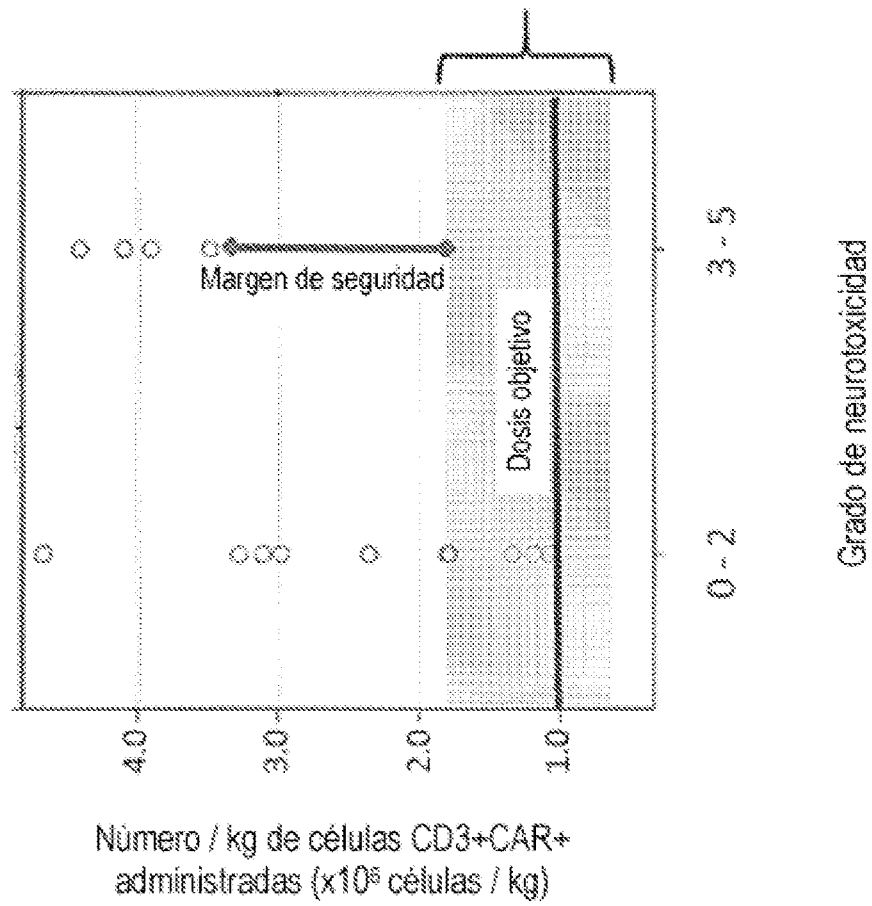


FIGURA 22

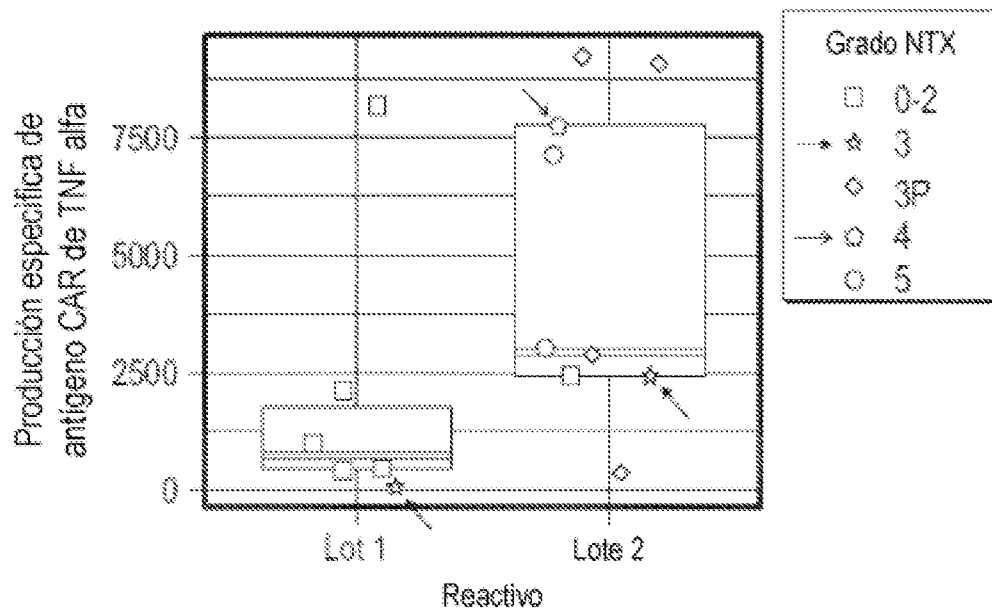


FIGURA 23A

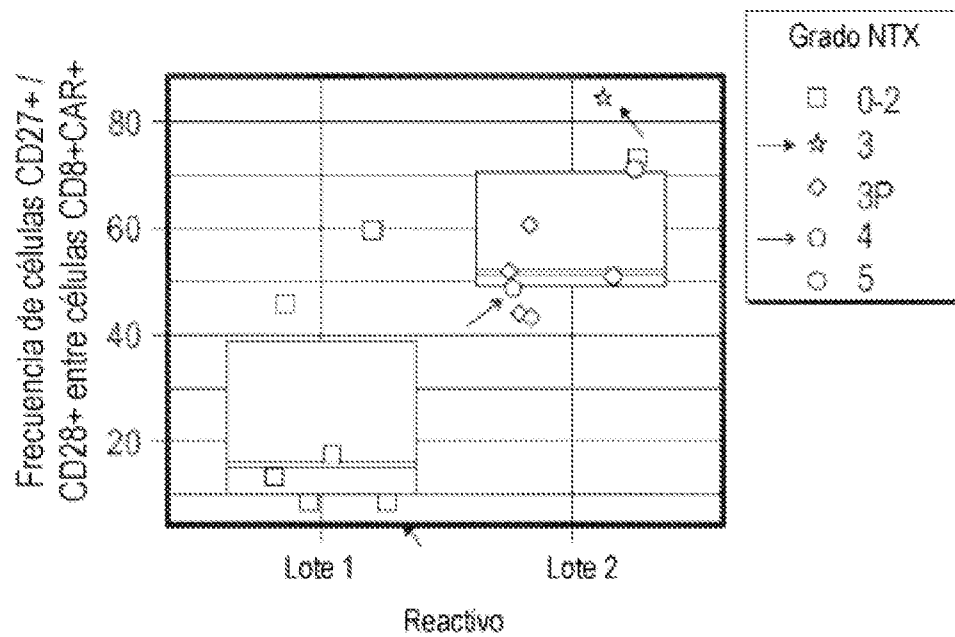


FIGURA 23B

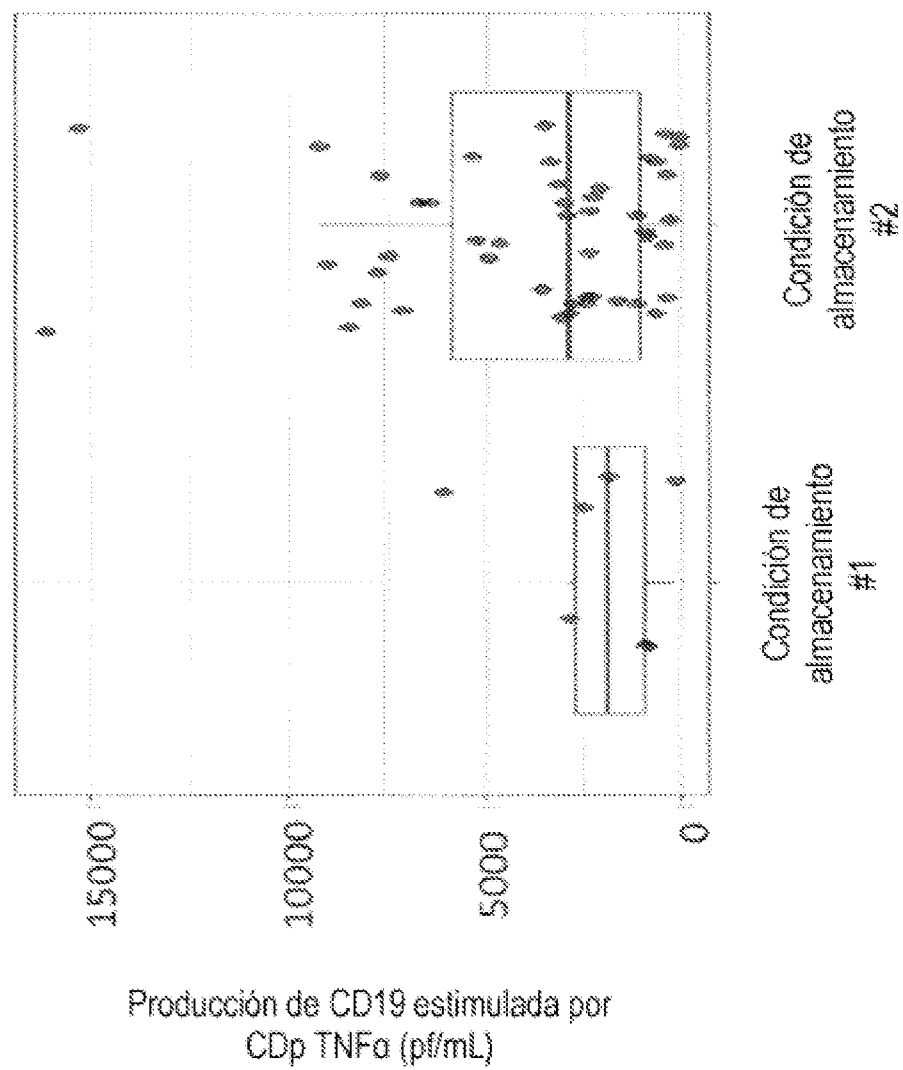


FIGURA 23C

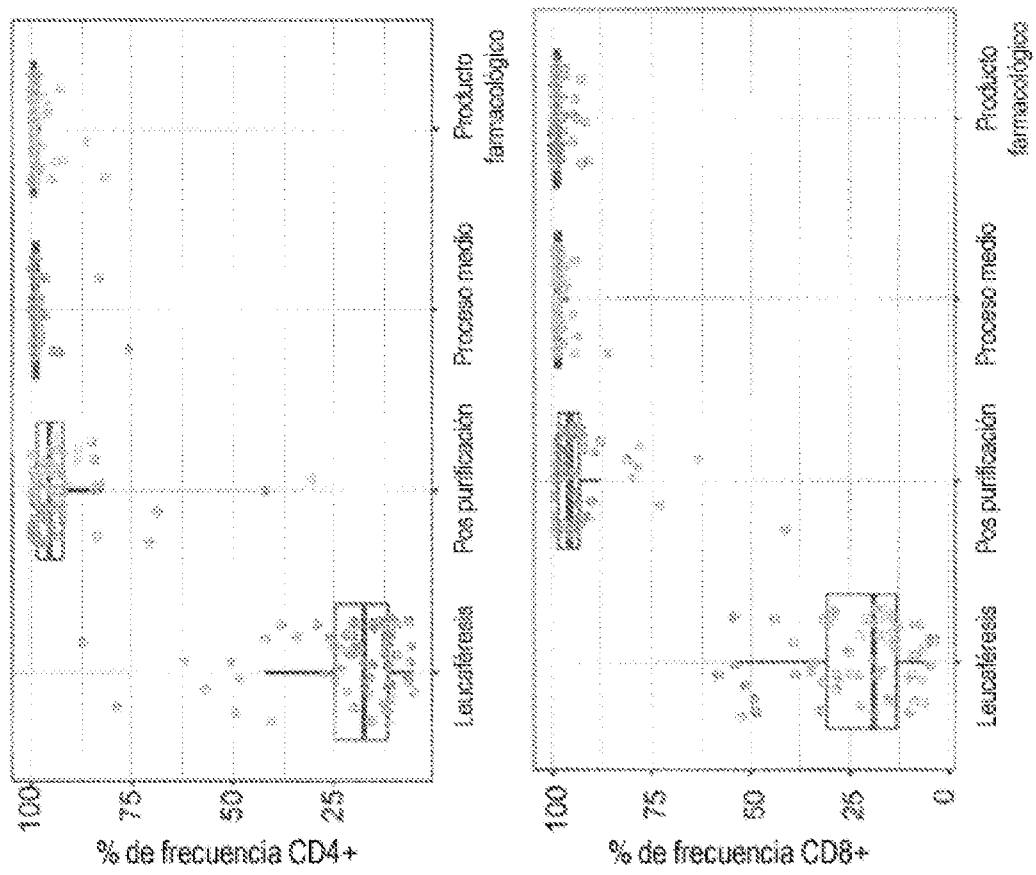


FIGURA 24

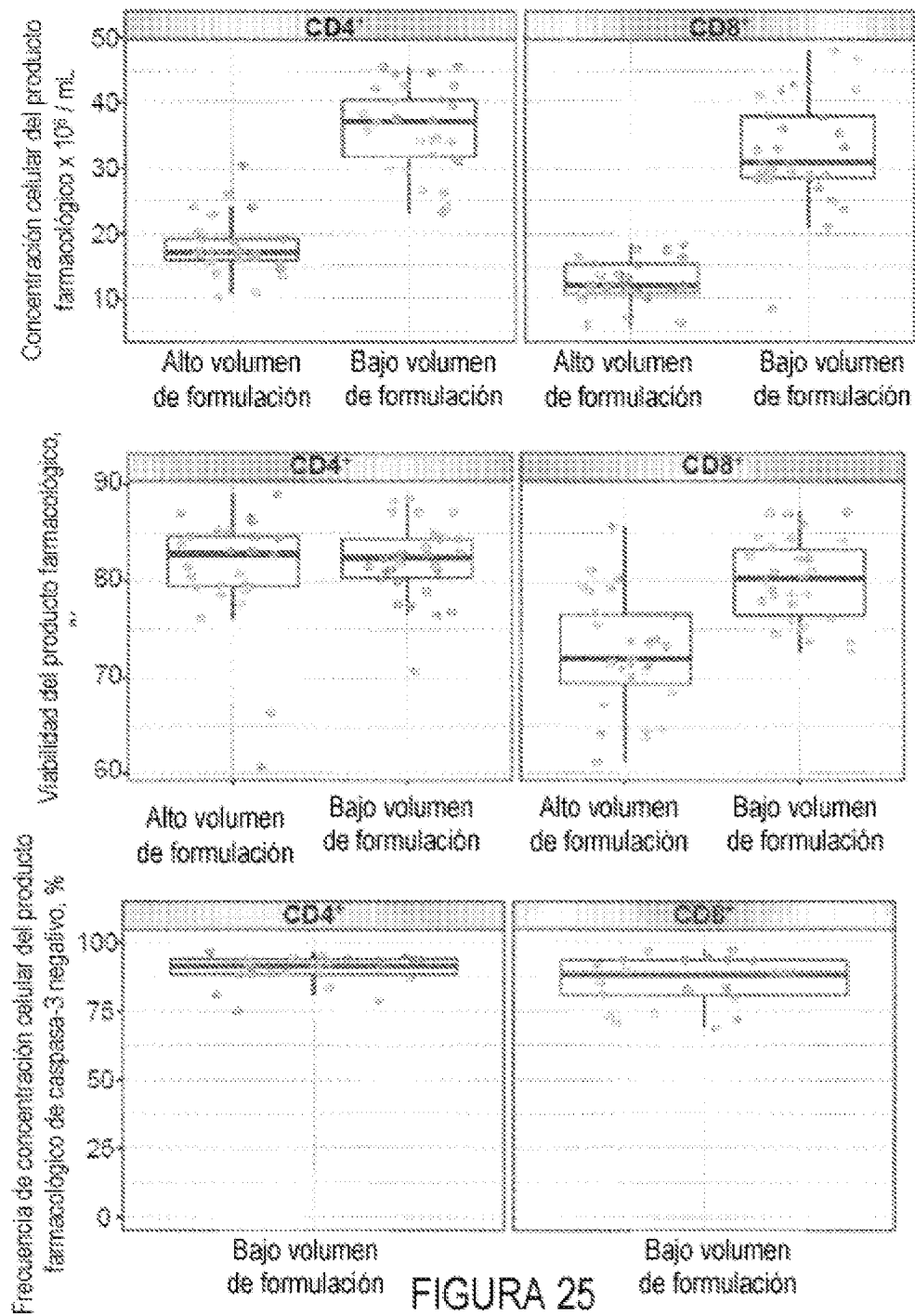


FIGURA 25

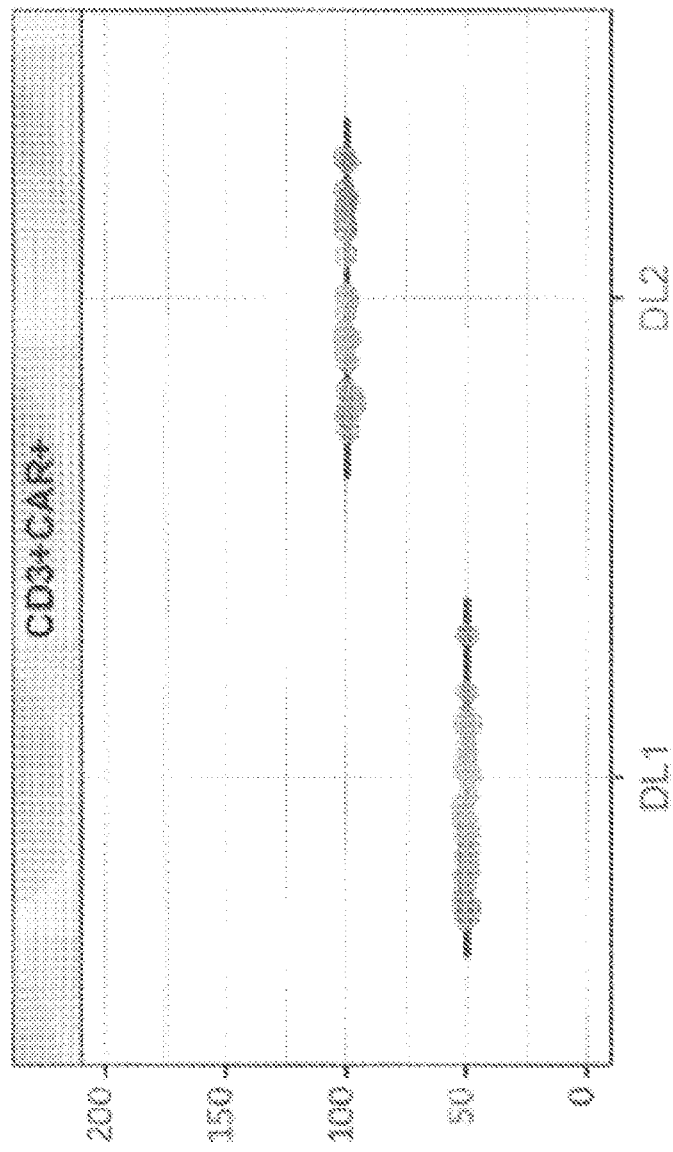


FIGURA 26

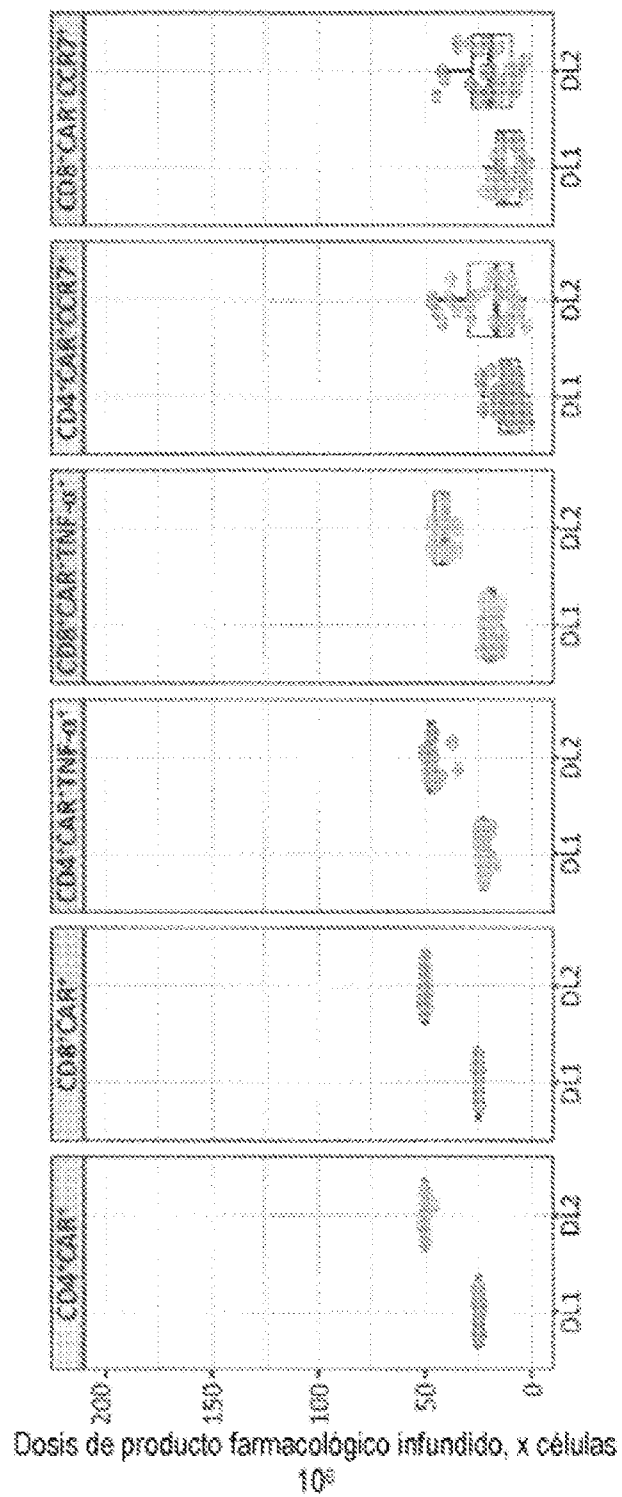


FIGURA 27

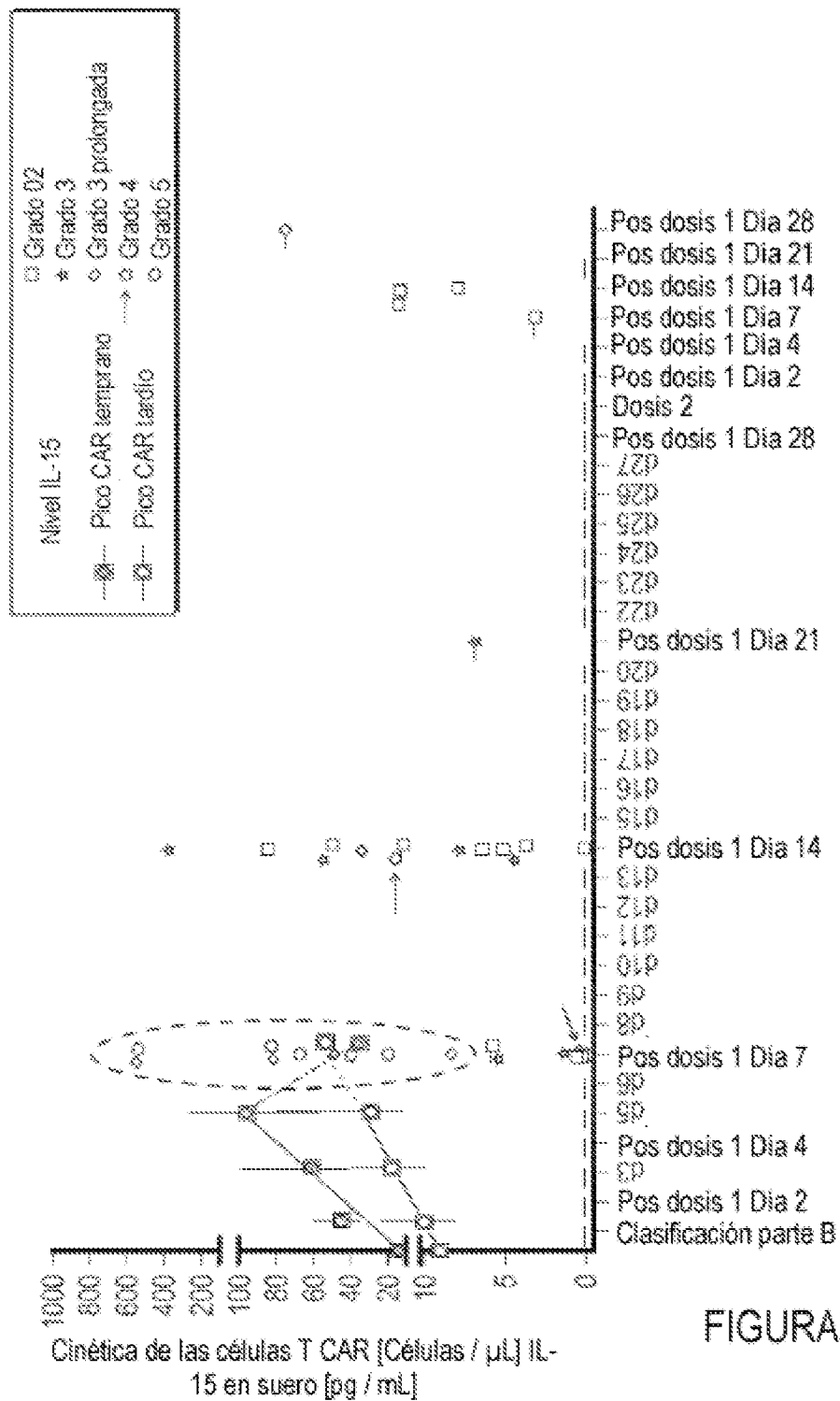


FIGURA 28