

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 946 785**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/17** (2015.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 39/02** (2006.01)  
**A61K 39/002** (2006.01)  
**A61K 39/12** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 31/00** (2006.01)  
**A61P 33/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.07.2016 PCT/IL2016/050775**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **19.01.2017 WO17009853**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.07.2016 E 16750269 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2023 EP 3322425**

54 Título: **Linfocitos T de memoria central anti-terceros modificados genéticamente y uso de los mismos en inmunoterapia**

30 Prioridad:

**16.07.2015 US 201562193207 P**  
**16.07.2015 US 201562193229 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.07.2023**

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO., LTD. (100.0%)**  
**at the Weizmann Institute of Science P.O. Box 95**  
**7610002 Rehovot, IL**

72 Inventor/es:

**REISNER, YAIR;**  
**OR-GEVA, NOGA;**  
**OPHIR, ERAN;**  
**EIDELSTEIN, YAKI y**  
**GIDRON BUDOVSKY, ROTEM**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

### Observaciones :

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

ES 2 946 785 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

Linfocitos T de memoria central anti-terceros modificados genéticamente y uso de los mismos en inmunoterapia

5 La presente invención, en algunos aspectos de la misma, se refiere a la tolerancia modificada genéticamente que inducen los linfocitos T de memoria central transducidos para expresar un receptor de la superficie celular y, más particularmente, pero no exclusivamente, al uso de los mismos en inmunoterapia.

10 La terapia celular adoptiva (ACT) es un procedimiento terapéutico en el que se administran linfocitos (por ejemplo, linfocitos T) a pacientes para tratar el cáncer o infecciones virales.

15 Este enfoque requiere la generación *ex-vivo* generación de linfocitos T específicos de tumor o virus y la infusión de los mismos a los pacientes. Para apoyar la aceptación de los linfocitos T, el paciente también suele ser tratado con protocolos de acondicionamiento, por ejemplo, protocolos de preacondicionamiento (p. ej., irradiación o quimioterapia) y/o administración de factores de crecimiento de linfocitos (como IL-2). Se han descrito muchos métodos para generar linfocitos específicos de tumores, siendo los dos enfoques principales la expansión de linfocitos T específicos de antígeno o la redirección de linfocitos T usando ingeniería genética.

20 De acuerdo con un enfoque, los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) se aíslan de la masa tumoral del propio paciente (por ejemplo, melanoma o cáncer renal), se expanden *ex-vivo* y se vuelven a infundir en el paciente. Los TIL son una fuente prometedora de células, ya que son un conjunto mixto de células propias del paciente que tienen receptores de linfocitos T (TCR) específicos de los antígenos asociados al tumor (TAA) presentes en el tumor. Sin embargo, solo son aplicables en los casos en que los linfocitos T pueden aislarse de una masa tumoral.

25 Este enfoque ha sido prometedor en el tratamiento del melanoma metastásico.

30 De acuerdo con otro enfoque, la modificación genética se utiliza para redirigir los linfocitos contra los tumores mediante el uso de cadenas de TCR transgénicos o receptores quiméricos. En la actualidad, la transferencia retroviral, lentiviral o electroporativa de receptores de antígenos quiméricos (CAR) cuyo reconocimiento de diana depende de un dominio de región variable de cadena única de un anticuerpo monoclonal (scFv) o de un receptor de linfocitos T (TCR) se usa normalmente para la producción estable de linfocitos T terapéuticos (linfocitos T-CAR o linfocitos T-TCR, respectivamente) [Fujiwara, Pharmaceuticals (2014) 7: 1049-1068].

35 Los linfocitos con TCR transgénico (T-TCR) requieren una molécula HLA específica para el reconocimiento del antígeno diana (es decir, restricción HLA) y tienen la capacidad de reconocer proteínas intracelulares, proporcionando una amplia gama de antígenos diana asociados a tumores o antígenos virales. La calidad terapéutica de los linfocitos T-TCR depende de su avidez. Para crear una mayor avidez se han implementado varias estrategias, que incluyen, el uso de TCR seleccionados de ratones transgénicos para HLA humano inmunizados con epítopos relevantes y/o la inserción de mutaciones dirigidas en las regiones CDR 2 o 3 de las regiones variables de las cadenas  $\alpha/\beta$  del TCR que interactúan con el complejo HLA/epitopo [Fujiwara, Pharmaceuticals (2014) *supra*].

40 De forma alternativa, los linfocitos CAR-T no están restringidos por el HLA. La construcción del receptor quimérico (receptor de antígeno quimérico - CAR) generalmente se compone de un dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización citoplasmático. El receptor quimérico original (es decir, de "primera generación") estaba compuesto por un fragmento scFv fusionado con un dominio intracelular de la cadena  $\xi$  de CD3.

45 También se generó un receptor quimérico de "segunda generación" que agrega un dominio de señalización intracelular, de varios receptores de proteínas coestimuladoras (por ejemplo, CD28, CD137, 4-1BB, ICOS), a la cola citoplasmática del CAR para proporcionar señales adicionales al linfocito T. Los estudios preclínicos han indicado que los CAR de "segunda generación" mejoran la actividad antitumoral de los linfocitos T. Recientemente se generó un CAR de "tercera generación" que combina múltiples dominios de señalización, tales como CD3zeta-CD28-4-1BB o CD3zeta-CD28-OX40, para aumentar aún más la potencia.

50 Los CAR específicos de tumores que se dirigen a una variedad de antígenos tumorales se están probando en la clínica para el tratamiento de una variedad de cánceres diferentes. Los ejemplos de estos cánceres y sus antígenos a los que se dirigen incluyen linfoma folicular (CD20 o GD2), neuroblastoma (CD171), linfoma no Hodgkin (CD20), linfoma (CD19), glioblastoma (IL13Ra2), leucemia linfocítica crónica o LLC y leucemia linfocítica aguda o LLA (ambas CD19). Los CAR que demuestran actividad contra tumores sólidos, incluidos los de ovario, próstata, mama, renal, colon, neuroblastoma y otros están en investigación. También se han desarrollado CAR específicos de virus para atacar células que albergan virus como el VIH. Por ejemplo, se inició un ensayo clínico utilizando un CAR específico de Gp100 para el tratamiento del VIH (Chicaybam, *Ibid*).

55 Un objetivo importante es aplicar ACT, incluidos los linfocitos T modificados genéticamente, utilizando células alogénicas total o parcialmente incompatibles sin recurrir al trasplante de médula ósea.

Se han contemplado varios enfoques para modificar los linfocitos T para la terapia celular adoptiva, algunos se describen en Gilham et al., Human Gene Therapy (2015) 26:276-285; en Sharpe and Mount, Disease Models and Mechanisms (2015) 8:337-350 y en Gouble et al. Blood (2014) 124(21) 4689.

- 5 Se han contemplado varios enfoques para la generación de células inductoras de tolerancia desprovistas de actividad de injerto contra hospedador (ICH) y el uso de las mismas para el trasplante de injertos, algunos de los cuales se resumen a continuación.

10 Reisner y colaboradores describieron un enfoque desarrollado para generar LTC de veto desprovistos de actividad ICH, en el que se estimularon los LTC contra estimuladores de terceros en ausencia de IL-2 exógena. Este enfoque se basó en la observación de que solo los precursores de linfocitos T citotóxicos (LTCp) activados eran capaces de sobrevivir a la privación de IL-2 en el cultivo primario (la ausencia de IL-2 da como resultado la apoptosis de los linfocitos T no inducidos). Este método demostró *in vitro* e *in vivo* que agotaba la reactividad de ICH de los LTC de veto anti-terceros [Publicación PCT N.º WO 2001/049243, Bachar-Lustig et al., Blood. 2003;102:1943-1950; Aviner et al., Hum Immunol. (2005) 66:644-652]. La introducción de estos LTC de veto anti-terceros en un receptor (junto con un trasplante) impidieron el rechazo del injerto sin inducir la enfermedad de injerto contra hospedador (EICH) (Publicación PCT N.º WO 2001/049243).

20 La publicación PCT N.º WO 2010/049935 divulga una población aislada de células que comprende células anti-terceros no inductoras de EICH que tienen un fenotipo de linfocito T de memoria central (T<sub>mc</sub>), siendo las células, células inductoras de tolerancia y capaces de anidar en los ganglios linfáticos después del trasplante.

25 La publicación PCT N.º WO 2013/035099 divulga nuevos métodos para generar una población aislada de células que comprenden células anti-terceros que tienen un fenotipo de linfocito T de memoria central (T<sub>mc</sub>), siendo las células, células inductoras de tolerancia y/o dotadas de actividad anti-enfermedad, y capaces de anidar en los ganglios linfáticos después del trasplante.

30 El documento WO 2014059173 se refiere a métodos y composiciones para modificar linfocitos T en los que PD1 y/o CTLA-4 se reprimen y/o inactivan usando proteínas de fusión tales como factores de transcripción artificiales y nucleasas.

35 El documento WO 2012129514 proporciona métodos y composiciones para conferir y/o aumentar las respuestas inmunitarias mediadas por inmunoterapia celular, como la transferencia adoptiva de linfocitos T CD8+ específicos de tumor modificados genéticamente en presencia de linfocitos T específicos de tumor, subconjunto específico de linfocitos T CD4+ modificados genéticamente, en donde los linfocitos T CD4+ confieren y/o aumentan la capacidad de los linfocitos T CD8+ para mantener la reactividad antitumoral y aumentar y/o maximizar la proliferación específica de tumor de los linfocitos T CD8+ específicos de tumor de interés. También se describen formulaciones farmacéuticas producidas por el método y métodos de uso de las mismas.

40 El documento WO 2014039044 proporciona métodos para producir una población aislada de células madre T de memoria, comprendiendo el método a) aislar linfocitos T vírgenes de un mamífero, en donde el mamífero no es un ratón; b) activar los linfocitos T vírgenes y expandir el número de linfocitos T vírgenes en presencia de uno o más estímulos de linfocitos T no específicos, una o más citocinas y un inhibidor de GSK-3beta. También se proporcionan métodos para producir una población aislada de células madre T de memoria, comprendiendo el método a) aislar linfocitos de un mamífero; b) clasificar los linfocitos usando citometría de flujo en una población que comprende un fenotipo que comprende i) CD95+, CD45RO- y CCR7+; y ii) CD62L+ o uno o más de CD27+, CD28+, CD45RA+ y CD127+ para producir una población aislada de células madre T de memoria. Otras realizaciones proporcionan células relacionadas, poblaciones de células, composiciones farmacéuticas y métodos para tratar o prevenir el cáncer.

50 El documento WO 2013035099 se refiere a un método para generar una población aislada de células que comprende células anti-terceros que tienen un fenotipo de linfocito T de memoria central (T<sub>mc</sub>), siendo las células, células inductoras de tolerancia y/o dotadas de actividad anti-enfermedad, y capaces de anidar en los ganglios linfáticos después del trasplante. El método comprende: (a) poner en contacto células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con un antígeno o antígenos de terceros en presencia de IL-21 para permitir el enriquecimiento de células reactivas al antígeno; y (b) cultivar las células resultantes de la etapa (a) en presencia de IL-21, IL-15 e IL-7 en un entorno libre de antígenos para permitir la proliferación de células que comprenden el fenotipo de linfocitos T de memoria central (T<sub>mc</sub>).

60 El documento WO 2014152177 se refiere a células, por ejemplo, linfocitos T que expresan polipéptidos de muerte celular artificial que causan la muerte de una célula, por ejemplo, células (por ejemplo, linfocitos T) que expresan el polipéptido de muerte celular, cuando el polipéptido de muerte celular está multimerizado o dimerizado. También se proporciona en este documento el uso de tales células, por ejemplo, linfocitos T, para tratar enfermedades tales como el cáncer.

65 Sumario de la invención

La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de las diversas vistas de los dibujos

5 Algunos aspectos de la divulgación se describen en el presente documento, a modo de ejemplo solamente, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se enfatiza que los detalles mostrados son a modo de ejemplo y con fines de análisis ilustrativo de los aspectos de la invención. En este sentido, la descripción tomada junto con los dibujos hace evidente a los expertos en la materia cómo pueden ponerse en práctica aspectos de la divulgación.

10 En los dibujos:

Las figuras 1A-C son ilustraciones esquemáticas de modelos para estudiar la capacidad de los linfocitos Tmc para inducir tolerancia en ausencia de las propiedades inductoras de la MO alogénica. La supervivencia y proliferación de células Tmc se analizó a través de FACS, mientras que la regulación a la baja de la actividad de los LTC del hospedador por células Tmc se probó utilizando el ensayo de  $^{51}\text{Cr}$ .

Las figuras 2A-B son gráficos que ilustran la persistencia de células F1-Tmc transferidas adoptivamente en el contexto de trasplante de médula ósea (TMO) singénico. Se trasplantaron ratones C57BL/6 (H-2b) como se describe en la figura 1A. Diagrama de dispersión representativo de un ratón en cada grupo, que muestra el porcentaje de células Tmc en sangre completa periférica de ratones, analizada 60 días después del trasplante por FACS usando  $\alpha\text{H2D}^d$  (Donante) y  $\alpha\text{H2K}^b$  para identificar las células F1( $\text{H2D}^d\text{XH2K}^b$ )-Tmc.

La figura 3 es un gráfico que ilustra que los linfocitos Tmc eliminan específicamente los linfocitos T anti-donante de una población policlonal de linfocitos T del hospedador (HTC), mientras que evita que otros HTC muestren actividad citotóxica. Los ratones se trasplantaron como se describe en la figura 1A. Sesenta días después del trasplante, se sacrificaron los ratones, se recolectaron bazo y ganglios linfáticos (LN) y se seleccionaron las células  $\text{CD8}^+$  (y se seleccionaron negativamente  $\text{H-2D}^d$  para excluir las Tmc). Estos HTC vírgenes fueron probados para determinar su capacidad de eliminar las dianas C3H (H-2 $^k$ ) o BALB/c (H-2 $^d$ ) en un ensayo de liberación de cromo. Las barras muestran el efecto de la eliminación de la siguiente manera: La eliminación de la diana C3H por HTC de ratones que reciben solo MO (barras negras, "MO solo C3H") o por células de ratones que reciben también Tmc (barras grises oscuras, "MO+Tmc solo C3H") o la eliminación de la diana BALB/c por HTC de ratones que recibieron solo MO (barras blancas, "MO solo BALB") o por linfocitos T de ratones que recibieron también Tmc (barras grises brillantes, "MO+Tmc BALB"). Los resultados se presentan como media  $\pm$  DE del porcentaje de eliminación de 12 pocillos para cada grupo. Se muestra el experimento representativo de 2 experimentos independientes realizados. (\*\*) Representa un valor de p inferior a 0,01, (\*\*\*) Representa un valor de p inferior a 0,001.

La figura 4 es un gráfico que ilustra que los linfocitos Tmc derivados de CB6 F1 persisten en ratones que recibieron 5,5 Gy TBI subletal con médula ósea singénica empobrecida en linfocitos T (TDBMT). Los ratones Balb/c ( $\text{H2D}^d$ ) se irradiaron de forma subletal (5,5 Gy) y se trasplantaron como se describe en la figura 1B. La sangre periférica se analizó 40, 80 y 132 días después del trasplante por FACS usando  $\alpha\text{H2D}^d$  (Hospedador) y  $\alpha\text{H2K}^b$  para identificar las células  $\text{H2D}^b$  F1-Tmc. Gráfico de dispersión que muestra el porcentaje de células Tmc de CB6 en cada ratón, cada punto representa la población de células Tmc en un ratón que pertenece al grupo apropiado, mostrando la media y la DE de cada grupo.

La figura 5 es un gráfico que ilustra la calibración de la dosis de irradiación que permite la supervivencia de células Tmc sin TDBMT. Los ratones Balb/c ( $\text{H2D}^d$ ) se irradiaron subletalmente con 2/4/5/5/6,5 Gy el día -1. El día 0, los ratones recibieron  $5 \times 10^6$  o  $9 \times 10^6$  células F1 CB6 (H-2 $^{db}$ ) Tmc transferidas adoptivamente en la vena de la cola de los ratones. Gráfico de dispersión que representa el porcentaje de células Tmc de CB6 en sangre completa periférica de ratones hospedadores Balb/c, analizada 42 días después del trasplante por FACS usando  $\alpha\text{H2D}^d$  (Hospedador) y  $\alpha\text{H2K}^b$  para identificar células  $\text{H2D}^b$  F1-Tmc. Se muestran la media y la DE de cada grupo.

Las figuras 6A-B son gráficos que ilustran que los linfocitos Tmc completamente alogénicos persisten en ratones Balb/c 5,5 Gy durante un período prolongado. Los ratones Balb/c (H-2 $^d$ ) se trasplantaron como se describe en la figura 1C. Las células Tmc eran de origen CB6-F1 (H-2 $^{db}$ ) o C57BL/6(H-2 $^b$ ). Los ratones se sangraron en los días indicados y la población de células Tmc se analizó mediante FACS usando  $\alpha\text{H2D}^d$  (Hospedador) y  $\alpha\text{H2K}^b$  (Donante) para identificar células  $\text{H2D}^b$  F1-Tmc y  $\text{H2}^b$  alo-Tmc. La Figura 6A es un diagrama de dispersión que representa el porcentaje de células Tmc en hospedadores Balb/c. Cada punto representa la población de células Tmc en un ratón que pertenece al grupo apropiado, mostrando la media y la DE de cada grupo. La figura 6B es un gráfico de curva de tiempo que ilustra la disminución de la población de células Tmc en sangre periférica durante un período de tiempo prolongado.

La figura 7 es un gráfico que ilustra que los linfocitos Tmc completamente alogénicos persisten en ratones Balb/c 5,5 Gy y facilitan el injerto de linfocitos T de donantes adicionales. Los ratones Balb/c (H-2 $^d$ ) recibieron 5,5 Gy TBI el día -1 y  $5 \times 10^6$  células Tmc derivadas de CB6 (H-2 $^{db}$ ) o C57BL/6(H-2 $^b$ ) el día 0. 89 días después de la inyección de células Tmc, los ratones fueron irradiados con 2 Gy TBI, al día siguiente recibieron  $2 \times 10^6$  células  $\text{CD45.1}^+$ ,  $\text{OT1}^+$ ,  $\text{RAG}^+$   $\text{CD8}^+$ . Gráfico de dispersión que muestra el sangrado el día 120 después del trasplante de células Tmc y 30 días después del trasplante de células OT-1.

La figura 8 es un gráfico que ilustra un análisis de células OT-1 en la sangre periférica de ratones Balb/c irradiados subletalmente. Los ratones Balb/c (H-2 $^d$ ) recibieron 5,25 Gy TBI el día -1 y seguidamente recibieron células vírgenes  $\text{CD8}^+$   $\text{OT-1}^+$   $\text{CD45.1}^+$   $\text{RAG}^+$  el día 0, con o sin células Tmc derivadas de CB6 (H-2 $^{db}$ ) o C57BL/6 (H-2 $^b$ ) en

los números indicados. Sesenta días después de la inyección de células Tmc, se analizó la sangre periférica de los ratones para detectar la presencia de células OT-1 usando análisis FACS. Gráfico de dispersión que muestra el porcentaje de células OT-1 de diferentes grupos de las células CD8<sup>+</sup>H-2<sup>b+</sup> totales. La figura 9 es un gráfico que ilustra el injerto y la supervivencia de células Tmc preparadas a partir de ratones OT-1 trasplantados en un modelo de ratón Balb/c de acondicionamiento de intensidad reducida.

#### Descripción de aspectos específicos de la invención

La presente invención, en algunos aspectos de la misma, se refiere a la tolerancia modificada genéticamente que inducen los linfocitos T de memoria central transducidos para expresar un receptor de la superficie celular y, más particularmente, pero no exclusivamente, al uso de los mismos en inmunoterapia.

Los principios y el funcionamiento de la presente divulgación pueden entenderse mejor en referencia a los dibujos y las descripciones adjuntas.

Antes de explicar al menos un aspecto de la divulgación en detalle, ha de comprenderse que la divulgación no está limitada necesariamente en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ejemplificados mediante los Ejemplos. La divulgación es susceptible de otros aspectos o de ponerse en práctica o de llevarse a cabo de diversas maneras. También, debe entenderse que la fraseología y la terminología empleadas en el presente documento son con fines descriptivos y no deberían interpretarse como limitantes.

Las terapias basadas en células con linfocitos y células presentadoras de antígenos son enfoques prometedores para la inmunoterapia. La transferencia de células adoptivas (ACT), incluida la transferencia de células de origen inmunitario, de una fuente autóloga o no autóloga ofrece el objetivo de transferir la funcionalidad y las características inmunológicas al hospedador. Un método empleado anteriormente para la ACT comprende linfocitos T modificados genéticamente (por ejemplo, que expresan un receptor de linfocitos T o un receptor de antígeno quimérico), en donde la especificidad de las células se redirige hacia el antígeno diana. Sin embargo, el problema del rechazo del injerto (por parte del receptor del trasplante) y/o la enfermedad del injerto contra el hospedador (por parte de las células trasplantadas) es un problema continuo que debe superarse para aprovechar el potencial terapéutico de estas células.

Al trasladar la presente divulgación a la práctica, los presentes inventores han descubierto que los linfocitos T de memoria central (Tmc) anti-terceros, que carecen de reactividad de injerto contra hospedador, están dotados de una actividad intrínseca inductora de tolerancia al veto y pueden inducir tolerancia por sí mismos, en ausencia de progenitores hematopoyéticos. Los presentes inventores descubrieron además que los linfocitos Tmc anti-terceros pueden modificarse genéticamente para expresar un receptor de linfocitos T (por ejemplo, un receptor de linfocitos T transgénico o un receptor de antígeno quimérico) y pueden usarse para combatir enfermedades a la vez que inducen actividad de veto y carecen de potencial injerto contra hospedador.

Como se muestra a continuación en el presente documento y en la sección de Ejemplos que sigue, los presentes inventores han demostrado que los linfocitos Tmc anti-terceros de tipo donante alogénico pueden sobrevivir en un hospedador durante un tiempo prolongado con o sin un trasplante de médula ósea concomitante (por ejemplo, más de 120 días, figuras 2A-B y figuras 6A-B, respectivamente). Además, los linfocitos Tmc anti-terceros ejercieron actividad de veto (figura 3). Por tanto, la aplicación de linfocitos Tmc anti-terceros solos (es decir, en ausencia de precursores de MO) ofrece una herramienta útil para la inmunoterapia, particularmente para dirigirse a antígenos tumorales, patógenos (por ejemplo, antígenos virales) y autoantígenos. Por tanto, estos resultados confirman aún más la modificación genética de los linfocitos Tmc anti-terceros tolerogénicos, de cualquier donante de células, para expresar funciones efectoras de linfocitos T heterólogas, dando como resultado un producto universal para la inmunoterapia dirigida a un antígeno patológico y evitando el rechazo del injerto y la enfermedad de injerto contra hospedador (EICH).

Consideradas en conjunto, estas células ofrecen la solución al estar desprovistas de potencial injerto contra hospedador, rechazo de injertos y direccionamiento a antígenos específicos, todo en una sola célula. Estas células eliminan la necesidad de usar células autólogas para el tratamiento o la necesidad de trasplantar células hematopoyéticas con las mismas. Además, estas células superan la necesidad de fabricar las terapias basadas en células "por paciente" y permiten la fabricación de un producto "listo para usar" para la terapia.

Por tanto, de acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, se proporciona una célula aislada que tiene un fenotipo de linfocito T de memoria central (Tmc), siendo la célula, una célula inductora de tolerancia y capaz de anidar en los ganglios linfáticos después del trasplante, siendo transducida la célula para expresar un receptor de la superficie celular que comprende un módulo de señalización del receptor de linfocitos T.

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula aislada" se refiere a una célula que se ha separado de su entorno natural (por ejemplo, de un tejido, por ejemplo, de un cuerpo humano).

La expresión "fenotipo de linfocito T de memoria central (Tmc)", como se usa en el presente documento, se refiere a un subconjunto de linfocitos T citotóxicos que anidan en los ganglios linfáticos. Las células que tienen el fenotipo Tmc,

en los seres humanos, normalmente comprenden una firma CD3+/CD8+/CD62L+/CD45RO+/CD45RA. Se apreciará que los linfocitos Tmc pueden expresar todos los marcadores de la firma en una sola célula o pueden expresar solo una parte de los marcadores de la firma en una sola célula.

5 Un linfocito Tmc normalmente se aloja en los ganglios linfáticos después del trasplante.

De acuerdo con algunos aspectos, el linfocito Tmc de la presente divulgación puede anidar en cualquiera de los ganglios linfáticos después del trasplante, como, por ejemplo, los ganglios linfáticos periféricos y los ganglios linfáticos mesentéricos. La naturaleza de anidamiento de estas células les permite ejercer su efecto de tolerancia de manera  
10 rápida y eficiente.

La expresión "células inductoras de tolerancia", como se usa en el presente documento, se refiere a células que provocan una disminución de la capacidad de respuesta de las células del receptor (por ejemplo, los linfocitos T del receptor) cuando entran en contacto con las células del donante en comparación con la capacidad de respuesta de  
15 las células del receptor en ausencia de células inductoras de tolerancia. Las células inductoras de tolerancia incluyen células veto (es decir, linfocitos T que conducen a la apoptosis de los linfocitos T del hospedador al entrar en contacto con los mismos) como se describió previamente en las Publicaciones PCT números WO 2001/049243 y WO 2002/102971.

20 De acuerdo con un aspecto, los linfocitos Tmc de la divulgación también son células inductoras de no EICH.

La expresión "no EICH", como se usa en el presente documento, se refiere a tener una reactividad inductora de injerto contra hospedador sustancialmente reducida o nula. Por tanto, las células de la presente divulgación se generan de manera que no causen de manera significativa la enfermedad de injerto contra hospedador (EICH) como lo demuestra  
25 la supervivencia, peso y aspecto general del sujeto trasplantado 30-100 días después del trasplante.

De acuerdo con un aspecto, las células de la presente divulgación tienen al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o incluso un 100 % de  
30 menor reactividad contra un hospedador respecto al trasplante de linfocitos T que no son linfocitos Tmc anti-terceros.

De acuerdo con un aspecto, la célula de la presente divulgación que comprende un fenotipo Tmc está modificada genéticamente.

35 De acuerdo con un aspecto, la célula de la divulgación se transduce para expresar un receptor de la superficie celular que comprende un módulo de señalización del receptor de linfocitos T.

Como se usa en el presente documento, el término "transducido" se puede usar de forma intercambiable con los términos "transfectado" o "transformado" y se refiere a un proceso mediante el cual se transfiere o introduce un ácido nucleico exógeno (heterólogo) en una célula. Una célula "transfectada" o "transformada" o "transducida" es una que se ha transfectado, transformado o transducido con ácido nucleico exógeno. La célula incluye la célula primaria y su progenie, o líneas celulares de la misma.  
40

La expresión "receptor de la superficie celular", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula sintética o recombinante presentada en una membrana celular que se une a un ligando (p. ej., un antígeno) y media en la activación de la célula.  
45

El término "antígeno" o "Ag" como se usa en el presente documento, se define como una molécula que provoca una respuesta inmunitaria. El experto en la materia entenderá que cualquier macromolécula, incluyendo virtualmente todas las proteínas o péptidos, así como los hidratos de carbono, los lípidos y el ADN pueden servir como antígeno.  
50

De acuerdo con algunos aspectos de la invención, el antígeno está asociado con una enfermedad maligna, es decir, antígeno tumoral (p. ej., antígeno específico de tumor o un antígeno asociado a tumor), un antígeno de proteína viral, un antígeno de proteína bacteriana, un antígeno de proteína fúngica, antígenos asociados con una reacción alérgica (es decir, antígenos alérgicos) o un antígeno asociado autoinmunitario (por ejemplo, un antígeno "propio"), como se describe con más detalle a continuación.  
55

El receptor de la superficie celular de la divulgación comprende un módulo de señalización del receptor de linfocitos T.  
60

La expresión "módulo de señalización del receptor de linfocitos T" se refiere a una porción intracelular del receptor responsable de la activación de al menos una de las funciones efectoras normales del linfocito T en el que se ha colocado el receptor. Las funciones efectoras normales de un linfocito T pueden incluir, por ejemplo, secreción de citocinas inmunoestimuladoras (por ejemplo, IFN-gamma, IL-2, TNF-alfa), citotoxicidad específica de antígeno y proliferación celular. Por tanto, el módulo de señalización del receptor de linfocitos T de la divulgación se refiere a la parte de una proteína que transduce la señal de función efectora y dirige a la célula para que realice una función  
65

especializada.

De acuerdo con un aspecto, el receptor de la superficie celular comprende un receptor de linfocitos T transgénico (tg-TCR) o un receptor de antígeno quimérico (CAR).

Como se usa en el presente documento, la expresión "receptor de linfocitos T transgénico" o "tg-TCR" se refiere a una molécula recombinante o sintética que comprende la especificidad de un receptor de linfocitos T (TCR), es decir, reconocimiento de péptidos antigénicos (es decir, antígeno) presentados por proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC).

El tg-TCR de la divulgación normalmente comprende dos cadenas (es decir, cadenas polipeptídicas), tal como, una cadena alfa de un receptor de linfocitos T (TCR), una cadena beta de un TCR, una cadena gamma de un TCR, una cadena delta de un TCR, o una combinación de las mismas (por ejemplo, cadenas  $\alpha\beta$  o cadenas  $\gamma\delta$ ). Los polipéptidos del tg-TCR pueden comprender cualquier secuencia de aminoácidos, con la condición de que el tg-TCR tenga especificidad antigénica y funciones efectoras de linfocitos T como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Se apreciará que la especificidad del antígeno está determinada por el heterodímero de TCR (es decir, por las cadenas  $\alpha\beta$  o  $\gamma\delta$ ).

Se apreciará que cada una de las dos cadenas se compone normalmente de dos dominios extracelulares, es decir, la región variable (V) y la región constante (C).

De acuerdo con un aspecto, el tg-TCR comprende las regiones variables de un TCR. De acuerdo con un aspecto específico, el tg-TCR comprende las regiones variables de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de un TCR. De acuerdo con otro aspecto específico, el tg-TCR comprende las regiones variables de las cadenas  $\gamma$  y  $\delta$  de un TCR.

De acuerdo con algunos aspectos de la invención, la región variable del tg-TCR comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que son capaces de unirse específicamente al antígeno. Las CDR se pueden seleccionar de cualquiera de CDR1, CDR2, CDR3 y/o CDR4. De acuerdo con un aspecto específico, las CDR están presentes en una sola cadena, preferentemente, las CDR están presentes en ambas cadenas del tg-TCR.

De acuerdo con un aspecto, el tg-TCR comprende las regiones constantes de un TCR. De acuerdo con un aspecto específico, el tg-TCR comprende las regiones constantes de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de un TCR. De acuerdo con otro aspecto específico, el tg-TCR comprende las regiones constantes de las cadenas  $\gamma$  y  $\delta$  de un TCR.

Para evitar la formación de dímeros mixtos entre los TCR endógenos (es decir, los TCR que se originan dentro de la célula transducida) y las cadenas de tg-TCR, el tg-TCR de la divulgación puede comprender la región constante de un TCR murino (por ejemplo, de ratón). Otro enfoque que se puede utilizar para aumentar el emparejamiento específico de cadenas del tg-TCR es introducir residuos de cisteína adicionales dentro de la región constante de las cadenas del tg-TCR (por ejemplo, cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ ), esto da como resultado la formación de un enlace disulfuro adicional. De forma alternativa, pueden introducirse inversiones mutacionales de los aminoácidos críticos que interactúan en las regiones constantes de la cadena del tg-TCR (p. ej., cadena  $\alpha$  y  $\beta$ ) que favorecen el emparejamiento de las cadenas del tg-TCR y también aumentan la reactividad del tg-TCR. Como alternativa o adicionalmente, la regulación a la baja del TCR endógeno puede implementarse utilizando, por ejemplo, ARN de interferencia pequeño (ARNip) que se utiliza para regular a la baja específicamente el TCR endógeno. Para más detalles, véase por ej. Zhang y Morgan, Adv Drug Deliv Rev. (2012) 64(8): 756-762.

Tal como se ha mencionado, el tg-TCR reconoce un antígeno de manera dependiente del MHC.

Como se usa en el presente documento, la expresión "complejo principal de histocompatibilidad" o "MHC" se refiere a un complejo de antígenos codificados por un grupo de loci vinculados, que se denominan colectivamente H-2 en el ratón y antígeno leucocitario humano (HLA) en humanos. Las dos clases principales de antígenos MHC, clase I y clase II, comprenden cada uno un conjunto de glicoproteínas de la superficie celular que desempeñan un papel en la determinación del tipo de tejido y la compatibilidad del trasplante.

Las principales moléculas del MHC de clase I se contemplan en el presente documento.

Las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I se expresan en la superficie de casi todas las células. Estas moléculas funcionan presentando péptidos que se derivan principalmente de proteínas sintetizadas endógenamente a los linfocitos T CD8+ a través de una interacción con la cadena  $\alpha\beta$  del receptor de linfocitos T. En los seres humanos, hay varios haplotipos del MHC, tal como, por ejemplo, HLA-A2, HLA-A1, HLA-A3, HLA-A24, HLA-A28, HLA-A31, HLA-A33, HLA-A34, HLA-B7, HLA-B45 y HLA-Cw8, cuyas secuencias se pueden encontrar en la base de datos kabbat, en [www.immuno\(dot\)bme\(dot\)nwu\(dot\)edu](http://www.immuno(dot)bme(dot)nwu(dot)edu). Se puede encontrar más información sobre los haplotipos del MHC en Paul, B. Fundamental Immunology Lippincott-Raven Press.

La elección del tg-TCR depende del tipo y número de antígenos que definen la superficie de una célula diana. Por ejemplo, el tg-TCR puede elegirse para reconocer un antígeno que actúa como un marcador de superficie celular en

una célula diana asociada con una patología particular. Por tanto, por ejemplo, los marcadores de superficie celular que pueden actuar como antígenos para el reconocimiento por parte del tg-TCR pueden incluir aquellos asociados con infecciones víricas, bacterianas y parasitarias, enfermedad autoinmunitaria y células cancerosas. A continuación, se proporcionan ejemplos.

Para generar un tg-TCR con éxito, primero se debe identificar una secuencia diana apropiada. Por consiguiente, un TCR puede aislarse de un linfocito T reactivo al antígeno (p. ej., linfocito T reactivo al tumor) o, cuando esto no es posible, pueden emplearse tecnologías alternativas. De acuerdo con un aspecto a modo de ejemplo, un animal transgénico (p. ej., conejo o ratón, preferentemente un ratón transgénico para HLA humano) se inmuniza con péptidos de antígenos humanos (p. ej., antígenos tumorales o virales) para generar linfocitos T que expresan TCR contra los antígenos humanos [como se describe, p. ej., en Stanislawski et al., Nat Immunol. (2001) 2(10):962-70]. De acuerdo con otro aspecto a modo de ejemplo, los linfocitos T específicos de antígeno (p. ej., linfocitos T específicos de tumor) se aíslan de un paciente que experimenta remisión de la enfermedad (p. ej., tumor) y las secuencias del TCR reactivo se aíslan del mismo [como se describe, p. ej., en de Witte et al., Blood (2006) 108(3):870].

De acuerdo con otro aspecto a modo de ejemplo, se emplean tecnologías *in vitro* para alterar la secuencia de un TCR existente para potenciar la avidez de un TCR específico de antígeno débilmente reactivo con un antígeno diana (dichos métodos se describen a continuación).

De acuerdo con un aspecto, el tg-TCR de la divulgación se selecciona para reconocer el complejo péptido antigénico-HLA con gran avidez (es decir, la fuerza física de la interacción monomérica entre el TCR y un complejo péptido-MHC).

La producción de células con una alta avidez funcional (es decir, que respondan eficazmente a los antígenos) se puede lograr utilizando cualquier método conocido por un experto en la materia. Por tanto, de acuerdo con un ejemplo, el aumento de la avidez del tg-TCR se logra aumentando la afinidad (es decir, la fuerza de unión de un TCR a su ligando) del tg-TCR o aumentando la expresión del tg-TCR en la superficie celular. De acuerdo con un aspecto ilustrativo, el aumento de la afinidad por el TCR se lleva a cabo mediante la modificación de los genes del tg-TCR. Por ejemplo, una posible modificación de los genes del tg-TCR incluye modificaciones en una región determinante de la complementariedad (CDR), p.ej. tercera CDR (CDR3), del tg-TCR. Por consiguiente, se pueden utilizar sustituciones de aminoácidos simples o dobles en las cadenas de la CDR (por ejemplo, cadenas  $\alpha$  o  $\beta$ ) para aumentar la afinidad del tg-TCR y potenciar la reactividad específica de antígeno en las células transducidas. De acuerdo con otro aspecto a modo de ejemplo, el aumento de la avidez funcional del tg-TCR se lleva a cabo mediante la eliminación de motivos de N-glicosilación definidos en los dominios constantes de las cadenas del tg-TCR. De acuerdo con otro aspecto a modo de ejemplo, el aumento de la afinidad se lleva a cabo mediante optimización de codones.

Por consiguiente, los codones raros del tg-TCR son reemplazados por codones distribuidos con mayor frecuencia en genes humanos altamente expresados. Durante el proceso de optimización, los estiramientos de secuencia rica en AT o GC que actúan en cis, también se pueden eliminar motivos de inestabilidad de ARN y corte y empalme críptico. Para información adicional, véase por ej. Zhang y Morgan, Adv Drug Deliv Rev. (2012), *supra*.

De acuerdo con un aspecto, el módulo de señalización del tg-TCR puede comprender una sola subunidad o una pluralidad de unidades de señalización. Por consiguiente, el tg-TCR de la divulgación puede usar correceptores que actúan en concierto con un TCR para iniciar la transducción de señales después de la interacción con el receptor del antígeno, así como cualquier derivado o variante del mismo que tenga la misma capacidad funcional.

De acuerdo con un aspecto, el módulo de señalización de TCR comprende el complejo CD3 (p. ej., cadenas de CD3, p. ej., cadenas CD3 $\delta/\epsilon$ , CD3 $\gamma/\epsilon$  y/o zeta, p. ej.,  $\zeta/\zeta$  o  $\zeta/\eta$ ).

Adicionalmente, o como alternativa, el módulo de señalización de TCR puede comprender receptores de proteínas coestimuladoras para proporcionar señales adicionales al linfocito T. Estos se analizan en detalle a continuación.

De acuerdo con un aspecto, el tg-TCR puede comprender un dominio transmembrana como se describe en detalle a continuación.

Los métodos para transducir una célula con un TCR se describen en detalle a continuación.

Como se usa en el presente documento, la expresión "receptor de antígeno quimérico (CAR)" se refiere a una molécula recombinante o sintética que combina la especificidad por un antígeno deseado con un dominio intracelular activador del receptor de linfocitos T (es decir, módulo de señalización del receptor de linfocitos T) para generar una proteína quimérica que presenta actividad inmunitaria celular al antígeno específico.

Por tanto, el CAR de la divulgación generalmente comprende un dominio extracelular que comprende un resto de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio intracelular (es decir, el dominio citoplasmático) que se requiere para una respuesta eficaz del linfocito T al antígeno.

*Resto de unión a antígeno*

En un aspecto, el CAR de la divulgación comprende un elemento de unión específico a la diana, también denominado resto de unión a antígeno. La elección del resto depende del tipo y número de ligandos (es decir, antígenos) que definen la superficie de una célula diana. Por ejemplo, el dominio de unión a antígeno puede elegirse para reconocer un ligando (es decir, un antígeno) que actúa como un marcador de la superficie celular en células diana con una patología particular. Por lo tanto, los ejemplos de marcadores de la superficie celular que pueden actuar como ligandos para el dominio del resto de unión a antígeno en el CAR de la divulgación incluyen aquellos asociados con infecciones víricas, bacterianas y parasitarias, enfermedad autoinmunitaria y células cancerosas.

De acuerdo con algunos aspectos de la invención, el resto de unión al anticuerpo comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que son capaces de unirse específicamente al antígeno. Tales CDR se pueden obtener a partir de un anticuerpo.

El término "anticuerpo" como se usa en la presente divulgación incluye moléculas intactas, así como fragmentos funcionales de las mismas, tales como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, anticuerpos lineales, anticuerpos scFv y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos que son capaces de unirse al antígeno. Estos fragmentos de anticuerpos funcionales se definen como se indica a continuación: (1) Fab, el fragmento que contiene un fragmento de unión a antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo, puede producirse mediante la digestión del anticuerpo completo con la enzima papaína para producir una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada; (2) Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpo que puede obtenerse tratando el anticuerpo completo con pepsina, seguido de reducción, para producir una cadena ligera inalterada y una porción de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo; (3) (Fab')<sub>2</sub>, el fragmento del anticuerpo que se puede obtener tratando el anticuerpo completo con la enzima pepsina sin reducción posterior; F(ab')<sub>2</sub> es un dímero de dos fragmentos Fab' unidos entre sí por dos enlaces disulfuro; (4) Fv, definido como un fragmento modificado genéticamente que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresadas como dos cadenas; (5) Anticuerpo monocatenario ("SCA"), una molécula modificada genéticamente que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada, unidas por un enlazador polipeptídico adecuado tal como una molécula monocatenaria fusionada genéticamente; (6) el péptido CDR es un péptido que codifica una sola región determinante de la complementariedad (CDR); y (7) anticuerpos de un solo dominio (también llamados nanocuerpos), un dominio de anticuerpo variable monomérico único modificado genéticamente que se une selectivamente a un antígeno específico. Los nanocuerpos tienen un peso molecular de solo 12-15 kDa, que es mucho más pequeño que un anticuerpo común (150-160 kDa).

Una "cadena pesada de anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere al mayor de los dos tipos de cadenas polipeptídicas presentes en todas las moléculas de anticuerpo en sus conformaciones naturales.

Una "cadena ligera de anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere al más pequeño de los dos tipos de cadenas polipeptídicas presentes en todas las moléculas de anticuerpo en sus conformaciones naturales. Las cadenas ligeras kappa y lambda se refieren a los dos isotipos principales de cadena ligera de los anticuerpos.

Por la expresión "anticuerpo sintético", como se usa en el presente documento, se entiende un anticuerpo que se genera utilizando tecnología de ADN recombinante, tal como, por ejemplo, un anticuerpo expresado por un bacteriófago como se describe en el presente documento. La expresión también debe interpretarse en el sentido de un anticuerpo que se ha generado mediante la síntesis de una molécula de ADN que codifica el anticuerpo, molécula de ADN que expresa una proteína de anticuerpo, o una secuencia de aminoácidos que especifica el anticuerpo, en donde la secuencia de aminoácidos o ADN se ha obtenido utilizando tecnología de secuencia de aminoácidos o ADN sintética que está disponible y se conoce bien en la técnica.

Los métodos para producir anticuerpos policlonales y monoclonales, así como fragmentos de los mismos, son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1988).

Los fragmentos de anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación se pueden preparar mediante hidrólisis proteolítica del anticuerpo o mediante expresión en células de E. coli o de mamífero (p. ej., cultivo de células de ovario de hámster chino u otros sistemas de expresión de proteínas) del ADN que codifica el fragmento. Los fragmentos de anticuerpo pueden obtenerse mediante digestión con pepsina o papaína de anticuerpos completos mediante métodos convencionales. Por ejemplo, se pueden producir fragmentos de anticuerpos por escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S denominado F(ab')<sub>2</sub>. Este fragmento puede escindirse adicionalmente usando un agente reductor de tiol y opcionalmente un grupo de bloqueo para los grupos sulfhidrilo resultantes de la escisión de enlaces disulfuro, para producir fragmentos monovalentes Fab' 3,5S. De forma alternativa, una escisión enzimática con pepsina produce dos fragmentos Fab' monovalentes y un fragmento Fc directamente. Estos métodos se describen, por ejemplo, por Goldenberg, en las patentes de Estados Unidos N.º 4.036.945 y 4.331.647 y las referencias contenidas en las mismas. Véase también Porter, R. R. [*Biochem. J.* 73: 119-126 (1959)]. También pueden usarse otros métodos para escindir anticuerpos, tales como la separación de cadenas pesadas para formar fragmentos monovalentes de cadenas ligeras y pesadas, la escisión adicional de fragmentos u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas, siempre que los fragmentos se unan al antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto.

Los fragmentos Fv comprenden una asociación de cadenas VH y VL. Esta asociación puede ser no covalente, como se describe en Inbar et al. [Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 69:2659-62 (1972)]. De forma alternativa, las cadenas variables pueden estar unidas por un enlace disulfuro intermolecular o reticuladas por productos químicos tal como el glutaraldehído. Preferentemente, los fragmentos Fv comprenden cadenas VH y VL conectadas por un enlazador peptídico. Se prepararon estas proteínas de unión a antígeno monocatenarias (sFv) construyendo un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios VH y VL conectados mediante un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión, que posteriormente se introduce en una célula hospedadora tal como E. coli. Las células hospedadoras recombinantes sintetizan una única cadena polipeptídica con un péptido enlazador que une los dos dominios V. Se describen métodos para producir sFv, por ejemplo, por [Whitlow y Filpula, Methods 2: 97-105 (1991); Bird *et al.*, Science 242:423-426 (1988); Pack et al., Bio/Technology 11:1271-77 (1993); y la Patente de Estados Unidos N.º 4.946.778.

Los péptidos de CDR ("unidades de reconocimiento mínimas") se pueden obtener mediante la construcción de genes que codifican la CDR de un anticuerpo de interés. Dichos genes se preparan, por ejemplo, mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable a partir del ARN de células productoras de anticuerpos. Véase, por ejemplo, Larrick y Fry [Métodos, 2: 106-10 (1991)].

Una vez que se identifican las CDR de un anticuerpo, usando técnicas convencionales de ingeniería genética, los polinucleótidos expresables que codifican cualquiera de las formas o fragmentos de anticuerpos descritos en el presente documento se pueden sintetizar y modificar de una de muchas maneras para producir un espectro de productos relacionados.

De acuerdo con algunos aspectos de la invención, las CDR se derivan de un receptor de linfocitos T (TCR)  $\alpha\beta$  que se une específicamente al antígeno.

De acuerdo con algunos aspectos de la invención, las CDR se derivan de un receptor de linfocitos T (TCR)  $\gamma\delta$  que se une específicamente al antígeno.

De acuerdo con algunos aspectos de la invención, las CDR se derivan de un receptor de linfocitos T (TCR)  $\alpha\beta$  o receptor de linfocitos T  $\gamma\delta$  modificado con afinidad mejorada que se une específicamente al antígeno (como se ha descrito en detalle anteriormente en el presente documento).

De acuerdo con algunos aspectos de la invención, las CDR se derivan de un receptor de linfocitos T (TCR)  $\alpha\beta$  o un receptor de linfocitos T  $\gamma\delta$  modificado con estabilidad mejorada o cualquier otra propiedad biofísica.

De acuerdo con algunos aspectos de la invención, las CDR se derivan de un anticuerpo similar al receptor de linfocitos T (TCRL) que se une específicamente al antígeno. Los ejemplos de TCRL y métodos para generar los mismos se describen en los documentos WO03/068201, WO2008/120203, WO2012/007950, WO2009125395, WO2009/125394.

De acuerdo con algunos aspectos de la invención, el dominio de unión a antígeno comprende una molécula Fv monocatenaria (scFv).

#### *Dominio citoplasmático*

El dominio citoplásmico (también denominado "dominio de señalización intracelular" o "módulo de señalización del receptor de linfocitos T") de la molécula CAR de la divulgación es responsable de la activación de al menos una de las funciones efectoras normales de la célula en la que se ha colocado el CAR.

Si bien habitualmente se puede emplear todo el dominio de señalización intracelular, en muchos casos no es necesario usar toda la cadena. En la medida en que se use una porción truncada del dominio de señalización intracelular, dicha porción truncada puede usarse en lugar de la cadena intacta siempre que transduzca la señal de función efectora. La expresión dominio de señalización intracelular pretende incluir cualquier porción truncada del dominio de señalización intracelular suficiente para transducir la señal de la función efectora.

Los ejemplos preferidos de dominios de señalización intracelular para su uso en la molécula CAR de la divulgación incluyen las secuencias citoplásmicas del receptor de linfocitos T (TCR) y los correceptores que actúan en concierto para iniciar la transducción de señales después del acoplamiento del receptor del antígeno, así como cualquier derivado o variante de estas secuencias y cualquier secuencia sintética que tenga la misma capacidad funcional.

Se sabe que las señales generadas a través del TCR solo son insuficientes para la activación completa del linfocito T y que también se requiere una señal secundaria o coestimuladora. Por tanto, la activación de los linfocitos T puede estar mediada por dos clases distintas de secuencias de señalización citoplasmática: las que inician la activación primaria dependiente de antígeno a través del TCR (secuencias de señalización citoplásmicas primarias) y las que actúan de forma independiente del antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora (secuencias de señalización citoplásmicas secundarias).

Las secuencias de señalización citoplásmica primarias regulan la activación primaria del complejo TCR ya sea de forma estimuladora o de forma inhibidora. Las secuencias de señalización citoplásmicas primarias que actúan de manera estimulante pueden contener motivos de señalización que se conocen como motivos de activación del inmunorreceptor basados en tirosina (ITAM).

Los ejemplos de ITAM que contienen secuencias de señalización citoplásmicas primarias que son de uso particular en la divulgación incluyen los derivados de TCR zeta, FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. Se prefiere particularmente que la molécula de señalización citoplásmica en el CAR de la divulgación comprenda una secuencia de señalización citoplásmica derivada de CD3 zeta.

En un aspecto preferido, el dominio citoplásmico del CAR puede diseñarse para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta por sí mismo o combinado con cualquier otro dominio citoplásmico deseado útil en el contexto del CAR de la invención. Por ejemplo, el dominio citoplásmico del CAR puede comprender una porción de la cadena CD3 zeta y una región de señalización coestimuladora. La región de señalización coestimuladora se refiere a una porción del CAR que comprende el dominio intracelular de una molécula coestimuladora. Una molécula coestimuladora es una molécula de superficie celular distinta de un receptor de antígeno o sus ligandos que es necesaria para una respuesta eficiente de los linfocitos a un antígeno. Los ejemplos de dichas moléculas incluyen CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno-1 asociado a la función de linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 y un ligando que se une específicamente con CD83 y similares. Por tanto, mientras que la divulgación se ilustra principalmente con 4-1BB como elemento de señalización coestimulador, otros elementos coestimuladores están dentro del alcance de la invención.

De acuerdo con algunos aspectos de la invención, el dominio intracelular comprende una región de señalización coestimuladora y una porción de cadena zeta. La región de señalización coestimuladora se refiere a una porción de la molécula de CAR que comprende el dominio intracelular de una molécula coestimuladora. Las moléculas coestimuladoras son moléculas de la superficie celular distintas de los receptores antigénicos o sus ligandos que se requieren para una respuesta eficiente de los linfocitos al antígeno.

"Ligando coestimulador", como se usa la expresión en el presente documento, incluye una molécula en una célula presentadora de antígeno [por ejemplo, una aAPC (célula presentadora de antígeno artificial), célula dendrítica, linfocito B, y similares] que se une específicamente a una molécula coestimuladora afín en un linfocito T, proporcionando de este modo una señal que, además de la señal primaria proporcionada mediante, por ejemplo, la unión de un complejo de TCR/CD3 con una molécula del MHC cargada con péptido, media una respuesta de linfocitos T, que incluyen, aunque no de forma limitativa, proliferación, activación, diferenciación y similares. Un ligando coestimulador puede incluir, pero sin limitación, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, ligando coestimulador inducible (ICOS-L), molécula de adhesión intercelular (ICAM, CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, receptor de linfotóxina beta, 3/TR6, ILT3, ILT4, HVEM, un agonista o anticuerpo que se une con el receptor de ligando Toll y un ligando que se une específicamente con B7-H3. Un ligando coestimulador también abarca, entre otros, un anticuerpo que se une específicamente con una molécula coestimuladora presente en un linfocito T, tal como, aunque no de forma limitativa, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno-1 asociado a la función de linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 y un ligando que se une específicamente con CD83.

Una "molécula coestimuladora" se refiere al compañero de unión afín en un linfocito T que se une específicamente con un ligando coestimulador, mediando de ese modo una respuesta coestimuladora por el linfocito T, tal como, aunque no de forma limitativa, proliferación. Las moléculas coestimuladoras incluyen, pero sin limitación, una molécula del MHC de clase I, BTLA y un receptor de ligando Toll.

Una "señal coestimuladora", como se usa en el presente documento, se refiere a una señal, que, en combinación con la señal primaria, tal como el ligamiento de TCR/CD3, conduce a la proliferación de linfocitos T y/o la regulación al alza o a la baja de las moléculas clave.

Por el término "estimulación", se entiende una respuesta primaria inducida por la unión de una molécula estimuladora (p. ej., un complejo TCR/CD3) con su ligando afín, mediando de este modo un acontecimiento de transducción de señal, tal como, aunque no de forma limitativa, transducción de señales a través del complejo TCR/CD3. La estimulación puede mediar en la expresión alterada de ciertas moléculas, tales como la regulación a la baja de TGF- $\beta$  y/o la reorganización de las estructuras del citoesqueleto y similares.

Una "molécula estimuladora", como se usa la expresión en el presente documento, significa una molécula en un linfocito T que se une específicamente con un ligando estimulador afín presente en una célula presentadora de antígeno.

Un "ligando estimulador", como se usa en el presente documento, significa un ligando que cuando está presente en una célula presentadora de antígeno (por ejemplo, una aAPC, una célula dendrítica, un linfocito B y similares) puede unirse específicamente con un compañero de unión afín (denominado en el presente documento como una "molécula

estimuladora") en un linfocito T, mediando de ese modo una respuesta primaria por el linfocito T, que incluyen, aunque no de forma limitativa, activación, inicio de una respuesta inmunitaria, proliferación y similares. Los ligandos estimulantes son bien conocidos en la técnica y abarcan, entre otros, una molécula MHC de clase I cargada con un péptido, un anticuerpo anti-CD3, un anticuerpo superagonista anti-CD28 y/o un anticuerpo superagonista anti-CD2.

Con respecto al dominio citoplasmático, la molécula CAR de algunos aspectos de la divulgación puede diseñarse para comprender el dominio de señalización CD28 y/o 4-1BB por sí mismo o combinarse con cualquier otro dominio o dominios citoplasmáticos deseados útiles en el contexto de la molécula CAR de algunos aspectos de la invención. En un aspecto, el dominio citoplasmático del CAR puede diseñarse para comprender además el dominio de señalización de CD3-zeta. Por ejemplo, el dominio citoplasmático del CAR puede incluir, entre otros, los módulos de señalización CD3-zeta, 4-1BB y CD28 y combinaciones de los mismos.

De acuerdo con algunos aspectos de la invención, el dominio intracelular comprende al menos uno, por ejemplo, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, por ejemplo, al menos seis de los polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en: CD3ζ (CD247, CD3z), CD27, CD28, 4-1BB/CD137, ICOS, OX40/CD134, DAP10, receptor del factor de necrosis tumoral (TNFr) y Lsk.

De acuerdo con algunos aspectos de la invención, el dominio intracelular comprende la cadena CD3ζ [molécula CD247, también conocidos como "CD3-ZETA" y "CD3z", Números de acceso de GenBank: NP\_000725.1 y NP\_932170.1], que es el principal transmisor de señales de los TCR endógenos.

De acuerdo con algunos aspectos de la invención, el dominio intracelular comprende varios receptores proteicos coestimuladores de la cola citoplásmica del CAR para proporcionar señales adicionales al linfocito T (CAR de "segunda generación"). Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, CD28 [por ejemplo, los números de acceso de GenBank NP\_001230006.1, NP\_001230007.1, NP\_006130.1], 4-1BB [superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, miembro 9 (TNFRSF9), también conocido como "CD137", por ejemplo, n.º de acceso de GenBank NP\_001552.2, ICOS [coestimulador inducible de linfocitos T, por ejemplo, n.º de acceso de GenBank NP\_036224.1, DAP10 [transductor de señal de células hematopoyéticas, por ejemplo, los números de acceso de GenBank NP\_001007470, NP\_055081.1] y Lsk [protooncogén LCK, tirosina cinasa de la familia Src, por ejemplo, los números de acceso de GenBank NP\_001036236.1, NP\_005347.3]. Los estudios preclínicos han indicado que la segunda generación de diseños de los CAR mejora la actividad antitumoral de los linfocitos T.

De acuerdo con algunos aspectos de la invención, el dominio intracelular comprende múltiples dominios de señalización, tales como CD3z-CD28-4-1BB o CD3z-CD28-OX40, para aumentar aún más la potencia. El término "OX40" se refiere a la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 4 (TNFRSF4), por ejemplo, N.º de acceso de GenBank NP\_003318.1 (CAR de "tercera generación").

De acuerdo con algunos aspectos de la invención, el dominio intracelular comprende CD28-CD3z, CD3z, CD28-CD137-CD3z. El término "CD137" se refiere a la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 9 (TNFRSF9), por ejemplo, N.º de referencia de GenBank NP\_001552.2.

De acuerdo con algunos aspectos de la invención, el dominio intracelular comprende CD3z, CD28 y un receptor del factor de necrosis tumoral (TNFr).

De acuerdo con algunos aspectos de la invención, el CAR comprende una cadena zeta CD3.

De acuerdo con algunos aspectos de la invención, el CAR comprende al menos un dominio coestimulador seleccionado del grupo que consiste en CD28, CD134/OX40, CD137/4-1BB, Lck, ICOS y DAP10.

De acuerdo con algunos aspectos de la invención, el CAR comprende al menos dos dominios coestimuladores seleccionados del grupo que consiste en CD28, CD134/OX40, CD137/4-1 BB, Lck, ICOS y DAP10.

#### *Dominio transmembrana*

El dominio transmembrana del CAR puede proceder de una fuente natural o sintética. Cuando la fuente es natural, el dominio puede derivar de cualquier proteína unida a la membrana o transmembrana. Las regiones transmembrana de uso particular en esta divulgación pueden derivar de (es decir, comprender al menos la región o regiones transmembrana de) la cadena alfa, beta o zeta del receptor de linfocitos T, CD28, CD3 epsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. Como alternativa, el dominio transmembrana puede ser sintético, en cuyo caso comprenderá predominantemente restos hidrófobos tales como leucina y valina. Preferentemente se encontrará un triplete de fenilalanina, triptófano y valina en cada extremo de un dominio transmembrana sintético.

Opcionalmente, un enlazador de oligopéptido o polipeptídico corto, preferentemente entre 2 y 10 aminoácidos de longitud puede formar el enlace entre el dominio transmembrana y el dominio de señalización citoplasmático del CAR. Un doblete glicina-serina proporciona un enlazador en particular adecuado.

De acuerdo con algunos aspectos de la invención, el dominio transmembrana comprendido en la molécula CAR de algunos aspectos de la divulgación es un dominio transmembrana que está asociado naturalmente con uno de los dominios del CAR. De acuerdo con algunos aspectos de la invención, el dominio transmembrana se puede seleccionar o modificar mediante sustitución de aminoácidos para evitar la unión de dichos dominios a los dominios transmembrana de las mismas o diferentes proteínas de membrana de la superficie para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo de receptor.

De acuerdo con algunos aspectos de la invención, el dominio transmembrana es el dominio bisagra CD8a.

De acuerdo con algunos aspectos, entre el dominio extracelular y el dominio transmembrana de la molécula CAR, o entre el dominio citoplasmático y el dominio transmembrana de la molécula CAR, puede haber incorporado un dominio espaciador. Como se usa en el presente documento, la expresión "dominio espaciador" generalmente significa cualquier oligo o polipéptido que funcione para unir el dominio transmembrana a, ya sea el dominio extracelular o, el dominio citoplasmático en la cadena polipeptídica. Un dominio espaciador puede comprender hasta 300 aminoácidos, preferentemente de 10 a 100 aminoácidos y lo más preferentemente de 25 a 50 aminoácidos.

Tal como se ha mencionado, el receptor de la superficie celular de la célula de la divulgación (p. ej., tg-TCR y/o CAR) se une a un antígeno (p. ej., en una célula diana).

De acuerdo con un aspecto, el antígeno puede comprender un antígeno asociado a un tumor, un antígeno viral, un antígeno bacteriano, un antígeno fúngico, un antígeno protozoario, un antígeno del parásito, un antígeno asociado a alergia y/o un antígeno autoinmunitario.

Como se usa en el presente documento, la expresión "antígeno tumoral" se refiere a un antígeno que es común a trastornos hiperproliferativos específicos tales como el cáncer. Los antígenos tumorales son proteínas producidas por las células tumorales que provocan una respuesta inmunitaria, particularmente las respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos T. La selección del resto de unión a antígeno de la divulgación dependerá del tipo particular de cáncer a tratar.

De acuerdo con un aspecto, el antígeno tumoral está asociado con un tumor sólido.

De acuerdo con un aspecto, el antígeno tumoral está asociado con una neoplasia hematológica.

El tipo de antígeno tumoral al que se hace referencia en la divulgación incluye un antígeno específico de tumor (TSA) o un antígeno asociado a tumor (TAA). Un "TSA" se refiere a una proteína o antígeno polipeptídico exclusivo de las células tumorales y que no se encuentra en otras células del cuerpo. Un "TAA" se refiere a una proteína o antígeno polipeptídico que es expresado por una célula tumoral. Por ejemplo, un TAA puede ser una o más proteínas o polipéptidos de superficie, proteínas nucleares o glicoproteínas, o fragmentos de las mismas, de una célula tumoral.

Los antígenos descritos en este documento se incluyen simplemente a modo de ejemplo. No se pretende que la lista sea exclusiva y los ejemplos adicionales serán fácilmente evidentes para los expertos en la materia.

Los antígenos tumorales son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, un antígeno asociado a glioma, antígeno carcinoembrionario (CEA), gonadotropina coriónica humana  $\beta$ , alfafetoproteína (AFP), AFP sensible a lectina, tiroglobulina, RAGE-1, MN-CAIX, transcriptasa inversa telomerasa humana, RU1, RU2 (AS), carboxilo esterasa intestinal, mut hsp70-2, M-CSF, prostasa, antígeno específico de la próstata (PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, p53, prostateína, PSMA, Her2/neu, survivina y telomerasa, antígeno 1 de tumor de carcinoma prostático (PCTA-1), MAGE, ELF2M, elastasa de neutrófilos, ephrinB2, CD22, factor de crecimiento de insulina (IGF)-I, IGF-II, receptor de IGF-I y mesotelina.

Estas moléculas incluyen, pero sin limitación, antígenos específicos de tejido como MART-1, tirosinasa y GP 100 en melanoma y fosfatasa ácida prostática (PAP) y antígeno específico de la próstata (PSA) en cáncer de próstata. Otras moléculas diana pertenecen al grupo de moléculas relacionadas con la transformación, como el oncogén HER-2/Neu/ErbB-2. Otro grupo más de antígenos diana son los antígenos oncofetales tales como el antígeno carcinoembrionario (CEA). En el linfoma de linfocitos B, la inmunoglobulina idiotípica específica de tumor constituye un antígeno de inmunoglobulina verdaderamente específico de tumor que es único para el tumor individual. Los antígenos de diferenciación de linfocitos B como CD19, CD20 y CD37 son otros candidatos para antígenos diana en el linfoma de linfocitos B. Algunos de estos antígenos (CEA, HER-2, CD19, CD20, idiotipo) se han utilizado como dianas para la inmunoterapia pasiva con anticuerpos monoclonales con un éxito limitado.

Los ejemplos no limitantes de antígenos TSA o TAA incluyen los siguientes: Antígenos de diferenciación como MART-1/MelanA (MART-1), gp100 (Pmel 17), tirosinasa, TRP-1, TRP-2 y antígenos multilínea específicos de tumores como MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15; antígenos embrionarios sobreexpresados tales como CEA; oncogenes sobreexpresados y genes supresores de tumores mutados como p53, Ras, HER-2/neu; antígenos tumorales únicos resultantes de translocaciones cromosómicas; tales como BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK,

MYL-RAR; y antígenos virales, tales como los antígenos del virus de Epstein Barr EBVA y los antígenos del virus del papiloma humano (HPV) E6 y E7. Otros antígenos basados en proteínas grandes incluyen TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, RAGE, NY-ESO, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17,1, NuMa, K-ras, beta-catenina, CDK4, Mum-1, p 15, p 16, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, alfa-fetoproteína, beta-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3\CA 27.291\BCAA, CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68\p1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733\EpCAM, HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90\proteína de unión a Mac-2\proteína asociada a ciclofilina C), TAAL6, TAG72, TLP y TPS.

Otros ejemplos de antígenos tumorales incluyen, pero sin limitación, A33, BAGE, Bcl-2,  $\beta$ -catenina, CA125, CA19-9, CD5, CD19, CD20, CD21, CD22, CD33, CD37, CD45, CD123, CEA, c-Met, CS-1, ciclina B1, DAGE, EBNA, EGFR, ephrinB2, receptor de estrógenos, FAP, ferritina, proteína de unión a folato, GAGE, G250, GD-2, GM2, gp75, gp100 (Pmel 17), HER-2/neu, HPV E6, HPV E7, Ki-67, LRP, mesotelina, p53 y PRAME. Se proporcionan antígenos tumorales adicionales en van der Bruggen P, Stroobant V., Vigneron N, Van den Eynde B. Peptide database: T cell-defined tumor antigens. *Cancer Immun* (2013), [www\(dot\)cancerimmunity\(dot\)org/peptide/](http://www(dot)cancerimmunity(dot)org/peptide/).

De acuerdo con un aspecto específico, el antígeno tumoral incluye, pero sin limitación, CD19, CD20, CD22, ROR1, mesotelina, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, Glicolípido F77, EGFRvIII, Her2, GD-2, gp100, p53, antígeno carcinoembrionario (CEA), MY-ESO-1, MART-1, MAGE A3, y similares.

De acuerdo con un aspecto, el antígeno diana es CD19.

De acuerdo con algunos aspectos de la invención, el antígeno es un antígeno viral. El antígeno viral puede derivar de cualquier virus, tal como, pero sin limitación, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la gripe, citomegalovirus (CMV), virus de la leucemia de linfocitos T tipo 1 (TAX), virus de la hepatitis C (VHC), (VHB), virus de Epstein Barr (VEB), Adenovirus (Adv), virus del resfriado, virus de la gripe, virus de la hepatitis A, B y C, herpes simple, encefalitis japonesa, sarampión, polio, rabia, sincitial respiratorio, rubéola, viruela, varicela zóster, rotavirus, virus del Nilo Occidental, poliomavirus (por ejemplo, virus BK) y/o virus zika.

De acuerdo con algunos aspectos de la invención, los antígenos virales incluyen, pero sin limitación, epítomos virales de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: factor de transcripción (TAX) del virus linfotrópico de linfocitos T humanos tipo I (HTLV-1), epítomo de proteína de matriz del virus de la gripe, epítomo derivado del virus de Epstein-Bar (EBV), TI del VIH-1, Gag del VIH, Pol del VIH, proteína de membrana M1 del virus de la gripe, hemaglutinina del virus de la gripe, neuraminidasa del virus de la gripe, nucleoproteína del virus de la gripe, nucleoproteína del virus de la gripe, proteína de matriz (M1) del virus de la gripe, canal de iones del virus de la gripe (M2), proteína no estructural del virus de la gripe NS-1, proteína no estructural del virus de la gripe NS-2, PA del virus de la gripe, PB1 del virus de la gripe, PB2 del virus de la gripe, proteína BM2 del virus de la gripe, proteína NB del virus de la gripe, proteína de la nucleocápside del virus de la gripe, proteína de matriz fosforilada del citomegalovirus (CMV) (pp65), TAX, virus de la hepatitis C (VHC), proteína pre-S del VHB 85-66, tax del HTLV-1 11-19, antígeno de superficie del VHB 185-194.

De acuerdo con algunos aspectos de la invención, el antígeno es un antígeno bacteriano. El antígeno bacteriano puede derivar de cualquier bacteria, tal como, pero sin limitación, carbunco; bacilos gramnegativos, clamidia, difteria, *Haemophilus influenza*, *Helicobacter pylori*, paludismo, Tuberculosis por *Mycobacterium*, toxina pertúsica, neumococo, rickettsias, estafilococos, estreptococos y tétanos.

De acuerdo con algunos aspectos de la invención, los antígenos bacterianos incluyen, pero sin limitación, los antígenos del carbunco incluyen, pero sin limitación, el antígeno protector del carbunco; los antígenos de bacilos gramnegativos incluyen, pero sin limitación, lipopolisacáridos; los antígenos del virus *Haemophilus influenza* incluyen, pero sin limitación, polisacáridos capsulares; los antígenos de la difteria incluyen, pero sin limitación, la toxina diftérica; Los antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* incluyen, pero sin limitación, ácido micólico, proteína de choque térmico 65 (HSP65), la principal proteína secretada de 30 kDa y el antígeno 85A; los antígenos de la toxina pertussis incluyen, pero sin limitación, hemaglutinina, pertactina, FIM2, FIM3 y adenilato ciclase; los antígenos neumocócicos incluyen, pero sin limitación, neumolisina y polisacáridos capsulares neumocócicos; los antígenos de Rickettsiae incluyen, pero sin limitación, rompA; los antígenos estreptocócicos incluyen, pero sin limitación, proteínas M; y los antígenos del tétanos incluyen, pero sin limitación, toxina tetánica.

De acuerdo con algunos aspectos de la invención, el antígeno es un antígeno de superbacteria (por ejemplo, bacterias resistentes a múltiples fármacos). Los ejemplos de superbacterias incluyen, pero sin limitación, *Enterococcus faecium*, *Clostridium difficile*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacteriaceae* (incluyendo *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp.).

De acuerdo con algunos aspectos de la invención, el antígeno es un antígeno fúngico. Ejemplos de hongos incluyen, pero sin limitación, *Candida*, *Coccidioides*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Leishmania*, *Plasmodium*, protozoos, parásitos, *Schistosomae*, los hongos causantes de la tiña, *Toxoplasma* y *Tripanosoma cruzi*.

De acuerdo con algunos aspectos de la invención, los antígenos fúngicos incluyen, pero sin limitación, los antígenos

de coccidioides incluyen, pero sin limitación, antígenos de esférulas; los antígenos criptocócicos incluyen, pero sin limitación, polisacáridos capsulares; los antígenos de histoplasma incluyen, pero sin limitación, proteína de choque térmico 60 (HSP60); los antígenos de *Leishmania* incluyen, pero sin limitación, gp63 y lipofosfoglicano; los antígenos de *Plasmodium falciparum* incluyen, pero sin limitación, antígenos de superficie de merozoítos, antígenos de superficie de esporozoítos, antígenos de circumsporozoíto, gametocitos/antígenos de superficie de gametos, antígenos de protozoos y otros parasitarios, incluido el antígeno del estadio sanguíneo pf 155/RESA; los antígenos de *Schistosoma* incluyen, pero sin limitación, glutatión-S-transferasa y paramiosina; los antígenos fúngicos de la tiña incluyen, pero sin limitación, tricoftina; los antígenos de *Toxoplasma* incluyen, pero sin limitación, SAG-1 y p30; y los antígenos de *Trypanosoma cruzi* incluyen, pero sin limitación, el antígeno de 75-77 kDa y el antígeno de 56 kDa.

De acuerdo con algunos aspectos de la invención, el antígeno es un antígeno expresado por células asociadas con una afección alérgica. Los ejemplos de antígenos alérgicos incluyen, pero sin limitación, antígenos de polen tales como antígenos de polen de cedro japonés, antígenos del polen de ambrosía, antígenos del polen de lolio, antígenos derivados de animales (como antígenos de ácaros del polvo y antígenos felinos), antígenos de histocompatibilidad, penicilina y otros fármacos terapéuticos.

De acuerdo con algunos aspectos de la invención, el antígeno es un autoantígeno asociado con un trastorno autoinmunitario.

La expresión "enfermedad autoinmunitaria", como se usa en el presente documento, se define como un trastorno que resulta de una respuesta autoinmunitaria. Una enfermedad autoinmunitaria es el resultado de una respuesta inadecuadamente excesiva a un autoantígeno.

Ejemplos de enfermedades autoinmunitarias incluyen, pero sin limitación, enfermedad de Addison, alopecia areata, espondilitis anquilosante, hepatitis autoinmunitaria, parotiditis autoinmunitaria, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), enfermedad celíaca, dermatitis (incluyendo dermatitis atópica y dermatitis eccematosa), diabetes de tipo I, epidermolísis ampollosa distrófica, epididimitis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, lupus eritematoso sistémico (LES), esclerosis múltiple (EM), miastenia grave, pénfigo vulgar, psoriasis, fiebre reumática, artritis (incluyendo artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, artrosis, artritis psoriásica), sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, síndrome de Stevens-Johnson, granulomatosis de Wegener, espondiloartropatías, tiroiditis, vasculitis, vitíligo, mixedema, anemia, asma, anemia perniciosa, colitis ulcerosa y accidente cerebrovascular, entre otros.

Como se usa en el presente documento, la expresión "péptido autoantigénico" se refiere a un antígeno derivado de una proteína endógena (es decir, propia) o consumida (por ejemplo, con los alimentos) contra la que se provoca una respuesta inflamatoria como parte de una respuesta inflamatoria autoinmunitaria.

Cabe señalar que los términos "endógena", "auto" son expresiones relativas que se refieren al individuo en el que se provoca la respuesta autoinmunitaria.

Los autoantígenos comprenden, pero sin limitación, proteínas celulares, fosfoproteínas, proteínas de la superficie celular, lípidos celulares, ácidos nucleicos, glucoproteínas, incluidos los receptores de la superficie celular.

De acuerdo con algunos aspectos de la divulgación, el péptido autoantigénico está asociado con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en diabetes, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad celíaca y accidente cerebrovascular.

Los autoantígenos de la esclerosis múltiple incluyen, pero sin limitación, proteínas de mielina como la proteína básica de mielina (MBP), proteína proteolipídica (PLP) y glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG).

Los autoantígenos asociados con la artritis reumatoide incluyen, pero sin limitación, péptidos autoantigénicos derivados del colágeno II (COL2A1), metaloproteínasa de matriz-1 (MMP1), precursor de la proteína del núcleo de agregano (ACAN), metaloproteínasa de matriz-16 (MMP16), tenascina (TNXB) y ribonucleoproteína nuclear heterogénea A2 (HNRNPA2B1).

Los autoantígenos de la diabetes tipo 1 (T1D) incluyen, pero sin limitación, antígenos expresados en los islotes pancreáticos, incluyendo ácido glutámico descarboxilasa (GAD65) y péptido autoantigénico de células beta.

Los autoantígenos celíacos (celiaquía) incluyen, pero sin limitación, gliadina (p. ej., alfa gliadina, gamma gliadina) y proteína de choque térmico 20.

enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa o enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), los autoantígenos incluyen, pero sin limitación, FAM84A, glicoproteína de membrana granular 2 (GP2), dominios CUB y tipo zona pelúcida 1 (CUZD1), complemento C3, catalasa y alfa-enolasa.

De acuerdo con algunos aspectos de la invención, los autoantígenos asociados con el accidente cerebrovascular

incluyen, pero sin limitación, péptidos autoantigénicos derivados de un antígeno cerebral como la proteína básica de mielina, neurofilamentos y el subtipo NR2A/2B del receptor de N-metil-D-aspartato (MOG-35-55).

De acuerdo con un aspecto de algunos aspectos de la divulgación, se proporciona un método para generar la célula aislada de algunos aspectos de la invención, comprendiendo el método transducir una célula que tiene un fenotipo de linfocito T de memoria central (Tmc), siendo la célula, una célula inductora de tolerancia y capaz de anidar en los ganglios linfáticos después del trasplante, con un polinucleótido que codifica un receptor de la superficie celular que comprende un módulo de señalización del receptor de linfocitos T.

De acuerdo con un aspecto, la célula que tiene el fenotipo de linfocito T de memoria central (Tmc), al ser una célula inductora de tolerancia y capaz de anidar en los ganglios linfáticos después del trasplante, es una célula anti-terceros.

La expresión "células anti-terceros" como se usa en el presente documento se refiere a linfocitos (es decir, linfocitos T) que se dirigen (es decir, mediante el reconocimiento de linfocitos T) contra un antígeno o antígenos de terceros.

Como se usa en el presente documento, la expresión "antígeno o antígenos de terceros" se refiere a un antígeno o antígenos solubles o no solubles (como los asociados a la membrana) que no están presentes ni en el donante ni en el receptor, como se muestra en detalle a continuación.

Por ejemplo, los antígenos de terceros pueden ser células de terceros, antígenos celulares (por ejemplo, antígenos de la superficie celular), antígenos de virus (es decir, antígeno viral), tal como, por ejemplo, virus de Epstein-Barr (EBV) o citomegalovirus (CMV), o antígenos de bacterias (es decir, antígeno bacteriano), como la flagelina. Los antígenos virales o bacterianos pueden ser presentados por células (p. ej., líneas celulares) infectadas con estos o preparadas de otro modo para expresar proteínas virales/bacterianas.

Las células presentadoras de antígeno autólogas o no autólogas, o un vehículo artificial o células presentadoras de antígeno artificial, se pueden usar para presentar péptidos sintéticos cortos fusionados o cargados en las mismas o para presentar extractos de proteínas o proteínas purificadas. Tales péptidos cortos, extractos de proteínas o proteínas purificadas pueden ser péptidos derivados de virus o bacterias o péptidos que representan cualquier otro antígeno.

Se puede usar un software especializado para analizar secuencias virales u otras para identificar péptidos cortos inmunogénicos, es decir, péptidos presentables en el contexto del MHC de clase I o MHC de clase II.

Las células de terceros pueden ser alogénicas o xenogénicas con respecto al receptor (explicado con más detalle a continuación). En el caso de células alogénicas de terceros, tales células tienen antígenos HLA diferentes a los del donante pero que no tienen reactividad cruzada con los antígenos HLA del receptor, de manera que las células anti-terceros generadas contra tales células no sean reactivas contra un trasplante o antígenos del receptor.

De acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, las células de terceros alogénicas o xenogénicas son células estimulantes seleccionadas del grupo que consiste en células purificadas de linfocitos de sangre periférica (PBL), bazo o ganglios linfáticos, PBL movilizados por citocinas, células presentadoras de antígeno (APC) expandidas *in vitro*, células dendríticas (DC) expandidas *in vitro* y células presentadoras de antígenos artificiales.

La APC artificial de la presente divulgación puede diseñarse para exhibir MHC autólogo con un péptido de terceros o un MHC de terceros sin ser pulsado con un péptido exógeno. Por tanto, de acuerdo con un aspecto, la APC artificial comprende células tumorales K562 transfectadas con un determinante MHC de terceros y una molécula coestimuladora [como ha descrito anteriormente, p. ej., Suhoski MM et al., Mol Ther. (2007) 15(5): 981-8], o fibroblastos transfectados con el mismo.

Los antígenos de terceros se pueden presentar en las superficies celulares, virales o bacterianas o derivadas y/o purificadas de las mismas. Adicionalmente, un antígeno viral o bacteriano se puede mostrar en una célula infectada y un antígeno celular se puede mostrar en un vehículo artificial como un liposoma o una célula presentadora de antígeno artificial (por ejemplo, una línea celular leucémica o de fibroblastos transfectada con el antígeno o antígenos de terceros).

El antígeno de terceros puede comprender además un péptido sintético presentado por células presentadoras autólogas, células presentadoras no autólogas o en un vehículo artificial o en células presentadoras de antígenos artificiales.

Asimismo, los antígenos de terceros pueden, por ejemplo, ser proteínas extraídas o purificadas de una variedad de fuentes. Un ejemplo de una proteína purificada que puede servir como antígeno de terceros de acuerdo con la presente divulgación es la ovoalbúmina. Se prevén otros ejemplos.

La utilización de células, células infectadas por virus, células infectadas por bacterias, células presentadoras de péptidos virales o células presentadoras de péptidos bacterianos como antígenos de terceros es particularmente ventajosa, ya que dichos antígenos de terceros incluyen una serie diversa de determinantes antigénicos y, como tales,

dirigen la formación de células anti-terceros de una población diversa, lo que puede servir además para la reconstitución más rápida de los linfocitos T en los casos en que se requiera tal reconstitución, por ejemplo, después de un procedimiento de quimioterapia o irradiación letal o subletal.

Es más, cuando las células anti-terceros se dirigen contra antígenos de terceros, las células están dotadas de actividad anti-enfermedad. La expresión "actividad anti-enfermedad" se refiere a la actividad (p. ej., capacidad de eliminación) de los linfocitos Tmc contra una célula enferma (p. ej., célula cancerosa, como la actividad injerto contra leucemia, GVL). Esta actividad se debe normalmente a la eliminación independiente del TCR mediada por la unión de LFA1-I/CAM1 [Arditti et al., Blood (2005) 105(8):3365-71. publicación electrónica 6 jul 2004].

De acuerdo con un aspecto, las células de terceros comprenden células dendríticas.

De acuerdo con un aspecto, las células de terceros comprenden células dendríticas maduras.

Los métodos de generación de células dendríticas de terceros, que pueden usarse como células estimuladoras para inducir linfocitos Tmc, son bien conocidos en la técnica. Por tanto, como un ejemplo no limitativo, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) pueden obtenerse de terceros como un donante de células no singénicas [p. ej., en caso de que los linfocitos Tmc sean singénicos, p.ej., las células dendríticas (DC) autólogas pueden ser no singénicas, p. ej., alogénicas, con respecto al sujeto; mientras que si los linfocitos Tmc son no singénicos, p. ej., alogénicos, las DC se seleccionan de un donante que es no singénico, p.ej., alogénico y no existe compatibilidad HLA ni con el sujeto ni con los linfocitos Tmc]. A continuación, los monocitos pueden aislarse mediante adherencia plástica y cultivarse (p. ej., en placas de cultivo celular) utilizando medio celular DC (p. ej., medio Cellgro DC) suplementado con suero humano (p. ej., suero humano al 1 %), penicilina/estreptomicina y GM-CSF (p. ej., 800 UI/ml) e IL-4 (p. ej., 20 ng/ml) (comercializado por, p. ej., Peprotech, Hamburgo, Alemania). Después de aproximadamente 24-72 h (por ejemplo, 48 h) de cultivo, se puede añadir el medio DC que comprende GM-CSF (p. ej., 1600 UI/ml) e IL-4 (p. ej., 20 ng/ml). Aproximadamente 12-36 h (por ejemplo, 24 h) más tarde, las células no adherentes pueden recolectarse y las células grandes (principalmente DC inmaduras) pueden resuspenderse en medio fresco que contiene GM-CSF (por ejemplo, 800 UI/ml), IL-4 (por ejemplo, 20 ng/ml), LPS (por ejemplo, de E. coli O55:B5 a, por ejemplo, 10 ng/ml) e IFN $\gamma$  (por ejemplo, 100 UI/ml) (comercializado por, por ejemplo, Peprotech, Hamburgo, Alemania), sembrarse e incubarse durante la noche. Al día siguiente, las células no adherentes se pueden desechar y las DC adherentes se pueden eliminar suavemente utilizando, p. ej., PBS frío/HS al 1 % después de la incubación en hielo durante aproximadamente 15-30 minutos (por ejemplo, 20 minutos), obteniendo de este modo células grandes que consisten en DC maduras.

De acuerdo con un aspecto, las células de terceros comprenden células dendríticas irradiadas.

Por tanto, de acuerdo con un aspecto, las DC se irradian con aproximadamente 5-10 Gy, aproximadamente 10-20 Gy, aproximadamente 20-30 Gy, aproximadamente 20-40 Gy, aproximadamente 20-50 Gy, aproximadamente 10-50 Gy. De acuerdo con un aspecto específico, las DC se irradian con aproximadamente 10-50 Gy (por ejemplo, 30 Gy).

Se puede usar cualquier método para producir linfocitos Tmc anti-terceros de acuerdo con la presente divulgación, como se describió previamente en las Publicaciones PCT números WO 2010/049935, WO 2012/032526 y WO 2013/035099.

De acuerdo con un aspecto, la generación de una célula anti-terceros que tenga un fenotipo Tmc puede llevarse a cabo mediante un método que comprende: (a) poner en contacto células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con un antígeno o antígenos de terceros en presencia o ausencia de IL-21 para permitir el enriquecimiento de células reactivas al antígeno; y (b) cultivar las células resultantes de la etapa (a) en presencia de IL-21, IL-15 e IL-7 en un entorno libre de antígenos para permitir la proliferación de células que comprenden el fenotipo de linfocitos T de memoria central (Tmc).

De acuerdo con un aspecto, las PBMC en la etapa (a) se ponen en contacto con un antígeno o antígenos de terceros en ausencia de IL-21.

De acuerdo con un aspecto, las PBMC en la etapa (a) se ponen en contacto con un antígeno o antígenos de terceros en presencia de IL-21.

De acuerdo con un aspecto, las células resultantes de la etapa (a) se cultivan en un entorno libre de antígenos (p. ej., sin la adición de un antígeno al cultivo celular) en presencia únicamente de IL-15. Se pueden añadir opcionalmente IL-21 y/o IL-7.

Los linfocitos Tmc anti-terceros de la presente divulgación se generan normalmente poniendo en contacto primero células mononucleares de sangre periférica (PBMC) singénicas (p. ej., autólogas) o no singénicas (p. ej., no autólogas como alogénicas o xenogénicas, como se describe con más detalle a continuación) con un antígeno o antígenos de terceros (como se ha descrito anteriormente) en un cultivo suplementado con IL-21 (p. ej., en un cultivo libre de citocinas, es decir, sin la adición de citocinas adicionales). Esta etapa se lleva a cabo normalmente durante aproximadamente 12-24 horas, aproximadamente 12-36 horas, aproximadamente 12-72 horas, 24-48 horas, 24-36

horas, aproximadamente 24-72 horas, aproximadamente 48-72 horas, 1-2 días, 2-3 días, 1-3 días, 2-4 días, 1-5 días, 2-5 días, 2-6 días, 1-7 días, 5-7 días, 2-8 días, 8-10 días o 1-10 días y permite el enriquecimiento de células reactivas al antígeno.

- 5 De acuerdo con un aspecto específico, el contacto de PBMC singénicas o no singénicas con un antígeno o antígenos de terceros (tal como se ha descrito anteriormente) en un cultivo suplementado con IL-21 (o de otra forma, cultivo sin citocinas) se efectúa durante 1-5 días (por ejemplo, 3 días).

- 10 El contacto de las PBMC singénicas o no singénicas con un antígeno o antígenos de terceros (como los descritos anteriormente) en un cultivo suplementado con IL-21 se lleva a cabo normalmente en presencia de aproximadamente 0,001-3000 UI/ml, 0,01-3000 UI/ml, 0,1-3000 UI/ml, 1-3000 UI/ml, 10-3000 UI/ml, 100-3000 UI/ml, 1000-3000 UI/ml, 0,001-1000 UI/ml, 0,01-1000 UI/ml, 0,1-1000 UI/ml, 1-1000 UI/ml, 10-1000 UI/ml, 100-1000 UI/ml, 250-1000 UI/ml, 500-1000 UI/ml, 750-1000 UI/ml, 10-500 UI/ml, 50-500 UI/ml, 100-500 UI/ml, 250-500 UI/ml, 100-250 UI/ml, 0,1-100 UI/ml, 1-100 UI/ml, 10-100 UI/ml, 30-100 UI/ml, 50-100 UI/ml, 1-50 UI/ml, 10-50 UI/ml, 20-50 UI/ml, 30-50 UI/ml, 1-30 UI/ml, 10-30 UI/ml, 20-30 UI/ml, 10-20 UI/ml, 0,1-10 UI/ml o 1-10 UI/ml de IL-21.

De acuerdo con un aspecto específico, la concentración de IL-21 es de 50-150 UI/ml (por ejemplo, 100 UI/ml).

- 20 De acuerdo con un aspecto específico, el contacto de las PBMC singénicas o no singénicas con un antígeno o antígenos de terceros se realiza en un cultivo libre de citocinas (por ejemplo, complementado solo con IL-21), tal condición de cultivo permite la supervivencia y el enriquecimiento solo de aquellas células que se someten a estimulación y activación por el antígeno o antígenos de terceros (es decir, de células reactivas al antígeno) ya que estas células secretan citocinas (por ejemplo, IL-2) que permiten su supervivencia (el resto de las células mueren en estas condiciones de cultivo).

- 25 La proporción entre antígeno o antígenos de terceros (p. ej., células dendríticas) y PBMC es normalmente de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:10, como aproximadamente 1:4, aproximadamente 1:6, aproximadamente 1:8 o aproximadamente 1:10.

- 30 De acuerdo con un aspecto específico, la proporción entre antígeno o antígenos de terceros (por ejemplo, células dendríticas) y PBMC es de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:8 (por ejemplo, 1:5).

- 35 A continuación, las células anti-terceros se cultivan en presencia de IL-21, IL-15 y/o IL-7 en un ambiente libre de antígeno para permitir la proliferación de células que comprenden el fenotipo Tmc. Esta etapa se lleva a cabo normalmente durante aproximadamente 12-24 horas, aproximadamente 12-36 horas, aproximadamente 12-72 horas, 24-48 horas, 24-36 horas, aproximadamente 24-72 horas, aproximadamente 48-72 horas, 1-20 días, 1-15 días, 1-10 días, 1-5 días, 5-20 días, 5-15 días, 5-10 días, 1-2 días, 2-3 días, 1-3 días, 2-4 días, 2-5 días, 2-8 días, 2-10 días, 4-10 días, 4-8 días, 6-8 días, 8-10 días, 7-9 días, 7-11 días, 7-13 días, 7-15 días, 10-12 días, 10-14 días, 12-14 días, 14-16 días, 14-18 días, 16-18 días o 18-20 días. De acuerdo con un aspecto específico, las células anti-terceros se cultivan en presencia de IL-21, IL-15 e IL-7 en un entorno libre de antígenos durante aproximadamente 7-11 días (p. ej., 8 días).

- 40 Esta etapa normalmente se lleva a cabo en presencia de IL-21 a una concentración de aproximadamente 0,001-3000 UI/ml, 0,01-3000 UI/ml, 0,1-3000 UI/ml, 1-3000 UI/ml, 10-3000 UI/ml, 100-3000 UI/ml, 1000-3000 UI/ml, 0,001-1000 UI/ml, 0,01-1000 UI/ml, 0,1-1000 UI/ml, 1-1000 UI/ml, 10-1000 UI/ml, 100-1000 UI/ml, 250-1000 UI/ml, 500-1000 UI/ml, 750-1000 UI/ml, 10-500 UI/ml, 50-500 UI/ml, 100-500 UI/ml, 250-500 UI/ml, 100-250 UI/ml, 0,1-100 UI/ml, 1-100 UI/ml, 10-100 UI/ml, 30-100 UI/ml, 50-100 UI/ml, 1-50 UI/ml, 10-50 UI/ml, 20-50 UI/ml, 30-50 UI/ml, 1-30 UI/ml, 10-30 UI/ml, 20-30 UI/ml, 10-20 UI/ml, 0,1-10 UI/ml o 1-10 UI/ml de IL-21.

- 50 De acuerdo con un aspecto específico, la concentración de IL-21 es de 50-150 UI/ml (por ejemplo, 100 UI/ml).

- 55 Esta etapa se lleva a cabo además en presencia de IL-15 a una concentración de aproximadamente 0,001-3000 UI/ml, 0,01-3000 UI/ml, 0,1-3000 UI/ml, 1-3000 UI/ml, 10-3000 UI/ml, 100-3000 UI/ml, 125-3000 UI/ml, 1000-3000 UI/ml, 0,001-1000 UI/ml, 0,01-1000 UI/ml, 0,1-1000 UI/ml, 1-1000 UI/ml, 10-1000 UI/ml, 100-1000 UI/ml, 125-1000 UI/ml, 250-1000 UI/ml, 500-1000 UI/ml, 750-1000 UI/ml, 10-500 UI/ml, 50-500 UI/ml, 100-500 UI/ml, 125-500 UI/ml, 250-500 UI/ml, 250-500 UI/ml, 125-250 UI/ml, 100-250 UI/ml, 0,1-100 UI/ml, 1-100 UI/ml, 10-100 UI/ml, 30-100 UI/ml, 50-100 UI/ml, 1-50 UI/ml, 10-50 UI/ml, 20-50 UI/ml, 30-50 UI/ml, 1-30 UI/ml, 10-30 UI/ml, 20-30 UI/ml, 10-20 UI/ml, 0,1-10 UI/ml o 1-10 UI/ml de IL-15. De acuerdo con un aspecto específico, la concentración de IL-15 es de 100-150 UI/ml (por ejemplo, 125 UI/ml).

- 60 Esta etapa se lleva a cabo además en presencia de IL-7 a una concentración de aproximadamente 0,001-3000 UI/ml, 0,01-3000 UI/ml, 0,1-3000 UI/ml, 1-3000 UI/ml, 10-3000 UI/ml, 30-3000 UI/ml, 100-3000 UI/ml, 1000-3000 UI/ml, 0,001-1000 UI/ml, 0,01-1000 UI/ml, 0,1-1000 UI/ml, 1-1000 UI/ml, 10-1000 UI/ml, 30-1000 UI/ml, 100-1000 UI/ml, 250-1000 UI/ml, 500-1000 UI/ml, 750-1000 UI/ml, 10-500 UI/ml, 30-500 UI/ml, 50-500 UI/ml, 100-500 UI/ml, 250-500 UI/ml, 100-250 UI/ml, 0,1-100 UI/ml, 1-100 UI/ml, 10-100 UI/ml, 30-100 UI/ml, 50-100 UI/ml, 1-50 UI/ml, 10-50 UI/ml, 20-50 UI/ml, 30-50 UI/ml, 1-30 UI/ml, 10-30 UI/ml, 20-30 UI/ml, 10-20 UI/ml, 0,1-10 UI/ml o 1-10 UI/ml de IL-7. De acuerdo con un aspecto

específico la concentración de IL-7 es de 10-50 UI/ml (30 UI/ml).

Los presentes inventores han recopilado a través de una laboriosa experimentación y selección una serie de criterios que pueden aprovecharse para mejorar la proliferación de células anti-terceros que comprenden un fenotipo de linfocitos T de memoria central (Tmc), sin células reactivas injerto contra hospedador (GVH) y/o potenciando las células reactivas antienfermedad (p. ej., GVL).

De acuerdo con un aspecto, las PBMC se agotan de células adherentes antes de ponerse en contacto con un antígeno o antígenos de terceros en presencia de IL-21.

De acuerdo con un aspecto, las PBMC se agotan de células CD4 y/o CD56+ antes de ponerse en contacto con un antígeno o antígenos de terceros en presencia de IL-21.

De acuerdo con un aspecto, las PBMC se seleccionan para las células CD45RA+ antes de ponerlas en contacto con un antígeno o antígenos de terceros en presencia de IL-21.

El agotamiento de las células CD4 y/o CD56 se puede llevar a cabo utilizando cualquier método conocido en la técnica, como por purificación basada en afinidad (por ejemplo, como mediante el uso de perlas MACS, clasificador FACS y/o marcado con ELISA de captura). Tal etapa puede ser beneficiosa para aumentar la pureza de las células CD8+ dentro del cultivo (es decir, eliminar otros linfocitos dentro del cultivo celular, por ejemplo, T CD4+ o linfocitos NK) o para aumentar el número de linfocitos T CD8+.

De acuerdo con un aspecto, las PBMC comprenden células no adherentes.

De acuerdo con un aspecto, las PBMC comprenden linfocitos T CD8+.

De acuerdo con un aspecto, las PBMC comprenden linfocitos T CD8+ vírgenes.

La selección de linfocitos T CD8+ vírgenes puede efectuarse mediante la selección de células que expresan CD45RA+ y/o células que expresan CD45RO- y puede llevarse a cabo utilizando cualquier método conocido en la técnica, como por purificación basada en afinidad (por ejemplo, como mediante el uso de perlas MACS, clasificador FACS y/o marcado con ELISA de captura).

De acuerdo con un aspecto, las PBMC comprenden células CD45RA+.

Una etapa adicional que puede llevarse a cabo de acuerdo con las presentes enseñanzas incluye cultivar las células PBMC con un antígeno o antígenos de terceros en presencia de IL-21, IL-15 e IL-7 antes de eliminar el antígeno o antígenos de terceros del cultivo celular (es decir, antes de generar un entorno libre de antígenos).

Esta etapa se lleva a cabo normalmente durante aproximadamente 12-24 horas, aproximadamente 12-36 horas, aproximadamente 12-72 horas, 24-48 horas, 24-36 horas, aproximadamente 24-72 horas, aproximadamente 48-72 horas, 1-2 días, 2-3 días, 1-3 días, 2-4 días, 1-5 días o 2-5 días, y se efectúa a las mismas dosis de IL-21, IL-15 e IL-7 indicadas anteriormente. De acuerdo con un aspecto específico, el cultivo de las células PBMC con un antígeno o antígenos de terceros en presencia de IL-21, IL-15 e IL-7 se lleva a cabo durante 12 horas a 4 días (por ejemplo, 1-2 días).

Adicionalmente, o como alternativa, puede llevarse a cabo un proceso adicional de dos etapas que permite la selección y el aislamiento de las células activadas. Tal etapa de selección facilita la eliminación de posibles linfocitos T reactivos del hospedador (por ejemplo, células alorreactivas) en situaciones en las que las PBMC no son singénicas con respecto al sujeto (como se describe con más detalle a continuación).

Por tanto, el aislamiento de células activadas puede llevarse a cabo en un enfoque de dos etapas. En la primera etapa, las células activadas se seleccionan antes de cultivar las células en presencia de IL-15 e IL-7. Esta primera etapa normalmente se lleva a cabo después del contacto inicial de las PBMC con un antígeno o antígenos de terceros en presencia de IL-21. Este proceso de selección selecciona solo aquellas células que fueron activadas por el antígeno de terceros (por ejemplo, expresa marcadores de activación como se describe a continuación) y generalmente se efectúa entre 12 y 24 horas, aproximadamente 24-36 horas, aproximadamente 12-36 horas, aproximadamente 36-48 horas, aproximadamente 12-48 horas, aproximadamente 48-60 horas, aproximadamente 12-60 horas, aproximadamente 60-72 horas, aproximadamente 12-72 horas, aproximadamente 72-84 horas, aproximadamente 12-84 horas, aproximadamente 84-96 horas, aproximadamente 12-96 horas, después del contacto inicial de las PBMC con un antígeno o antígenos de terceros.

De acuerdo con un aspecto específico, el proceso de selección se efectúa aproximadamente 12-24 horas (por ejemplo, 14 horas) después del contacto inicial de las PBMC con un antígeno o antígenos de terceros.

El aislamiento de células activadas puede efectuarse mediante purificación basada en afinidad (por ejemplo, mediante

el uso de perlas MACS, clasificador FACS y/o marcado con ELISA de captura) y puede efectuarse con cualquier marcador de activación, incluidos los marcadores de la superficie celular, tales como, aunque no de forma limitativa, CD69, CD44, CD25, CFSE, CD137 o marcadores no de superficie celular tales como, aunque no de forma limitativa, IFN- $\gamma$  e IL-2. El aislamiento de células activadas también puede efectuarse mediante purificación basada en la morfología (p. ej., aislamiento de células grandes) utilizando cualquier método conocido en la técnica (p. ej., mediante FACS). Normalmente, las células activadas también se seleccionan para la expresión de células CD8+. Es más, se puede utilizar cualquier combinación de los métodos anteriores para aislar eficazmente las células activadas.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, la selección de células activadas se efectúa mediante la selección de células CD137+ y/o CD25+.

La segunda etapa de aislamiento de las células activadas normalmente se lleva a cabo al final del cultivo (es decir, después del cultivo en un entorno libre de antígenos con IL-21, IL-15 y IL-7). Esta etapa agota las células alorreactivas mediante el agotamiento de aquellas células que se activaron después del contacto del linfocito T de memoria central (Tmc) con células presentadoras de antígeno del hospedador irradiadas (APC, por ejemplo, células dendríticas). Como se ha mencionado anteriormente, el aislamiento de células activadas puede efectuarse mediante purificación basada en afinidad (por ejemplo, mediante el uso de perlas MACS, clasificador FACS y/o marcado con ELISA de captura) y puede efectuarse con cualquier marcador de activación, incluidos los marcadores de la superficie celular, tales como, aunque no de forma limitativa, CD69, CD44, CD25, CFSE, CD137 o marcadores no de superficie celular tales como, aunque no de forma limitativa, IFN- $\gamma$  e IL-2.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, el agotamiento de las células alorreactivas se efectúa mediante el agotamiento de las células CD137+ y/o CD25+ y/o la captura de IFN $\gamma$ .

Los siguientes son protocolos de ejemplo que se pueden usar de acuerdo con algunos aspectos de la invención.

Aquí se proporciona un método para generar una célula aislada que tiene un fenotipo de memoria central, siendo la célula, una célula inductora de tolerancia y capaz de anidar en los ganglios linfáticos después del trasplante, comprendiendo el método: (a) poner en contacto células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con un antígeno o antígenos de terceros en presencia de IL-21 (por ejemplo, durante 12 horas a 5 días) para permitir el enriquecimiento de células reactivas al antígeno; y (b) cultivar las células resultantes de la etapa (a) en presencia de IL-21, IL-15 e IL-7 en un entorno libre de antígenos (por ejemplo, durante 5-20 días) para permitir la proliferación de células anti-terceros que comprenden el fenotipo de linfocitos T de memoria central (Tmc).

De acuerdo con un aspecto, el método comprende además (c) separar las células resultantes de la etapa (b) en suspensiones de células individuales.

De acuerdo con un aspecto, el método comprende además agotar las células adherentes de las PBMC antes de la etapa (a).

De acuerdo con un aspecto, el método comprende además agotar las células CD4+ y/o CD56+ de las PBMC antes de la etapa (a).

De acuerdo con un aspecto, el método comprende además seleccionar las células activadas después de la etapa (a) y antes de la etapa (b).

De acuerdo con un aspecto, el método comprende además seleccionar las células activadas que se efectúa mediante la selección de células CD137+ y/o CD25+.

Aquí se proporciona un método para generar una célula aislada que tiene un fenotipo de memoria central, siendo la célula, una célula inductora de tolerancia y capaz de anidar en los ganglios linfáticos después del trasplante, comprendiendo el método: (a) tratar células mononucleares de sangre periférica (PBMC) no adherentes con un agente capaz de reducir los linfocitos CD4+ y/o CD56+ para obtener linfocitos T CD8+; (b) poner en contacto los linfocitos T CD8+ con células dendríticas de terceros en presencia de IL-21 (por ejemplo, durante 12 horas a 5 días) para permitir el enriquecimiento de células reactivas al antígeno; (c) cultivar las células resultantes de la etapa (b) con las células dendríticas de terceros en presencia de IL-21, IL-15 e IL-7 (por ejemplo, durante 12 horas a 3 días); y (d) cultivar las células resultantes de la etapa (c) en presencia de IL-21, IL-15 e IL-7 en un entorno libre de antígenos (por ejemplo, durante 5-20 días) para permitir la proliferación de células que comprenden el fenotipo de linfocitos T de memoria central (Tmc).

De acuerdo con un aspecto, el método comprende además separar las células resultantes de la etapa (d) en suspensiones de células individuales.

De acuerdo con un aspecto, las células anti-terceros que comprenden el fenotipo Tmc comprenden una firma CD3+, CD8+, CD62L+, CD45RA-, CD45RO+.

Se valorará que al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o incluso un 100 % de las células anti-terceros son células CD3+CD8+. De acuerdo con un aspecto específico, las células anti-terceros comprenden aproximadamente el 70-90 % de células CD3+CD8+.

Se valorará que al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o incluso un 100 % de las células CD3+CD8+ tienen la firma de linfocito Tmc. De acuerdo con un aspecto específico, aproximadamente un 30-80 % de las células CD3+CD8+ tienen la firma de linfocito Tmc (por ejemplo, 40-50 %).

De acuerdo con un aspecto, al menos un 50 % de las células son linfocitos CD3+CD8+ de los cuales al menos un 50 % tienen la firma.

Por tanto, las células de la divulgación que tienen un fenotipo de linfocito T de memoria central (Tmc) no se producen de forma natural y no son un producto de la naturaleza. Estas células son normalmente producidas por manipulación *ex-vivo* (es decir, exposición a un antígeno o antígenos de terceros en presencia de citocinas específicas).

Tal como se ha mencionado, el linfocito Tmc de la divulgación se transduce con un polinucleótido que codifica un receptor de la superficie celular que comprende un módulo de señalización del receptor de linfocitos T.

Como se usa en el presente documento, el término "polinucleótido" se refiere a una secuencia de ácido nucleico monocatenaria o bicatenaria que se aísla y se proporciona en forma de una secuencia de ARN, una secuencia polinucleotídica complementaria (ADNc), una secuencia polinucleotídica genómica y/o una secuencia polinucleotídica compuesta (p. ej., una combinación de las anteriores).

El término "aislado" se refiere al menos parcialmente separado del entorno natural, por ejemplo, de una célula, o de un tejido, por ejemplo, de un cuerpo humano.

El polinucleótido aislado se puede obtener utilizando métodos recombinantes conocidos en la técnica, tal como, por ejemplo, cribado de bibliotecas de células que expresan el gen, derivando el gen de un vector que se sabe que lo incluye, o aislándolo directamente de células y tejidos que lo contienen, usando técnicas convencionales. De forma alternativa, el gen de interés se puede producir sintéticamente, en lugar de clonado.

El polinucleótido de acuerdo con algunos aspectos de la divulgación puede comprender un solo polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio extracelular, el dominio transmembrana y/o el módulo de señalización del receptor de la superficie celular (por ejemplo, tg-TCR y/o CAR). De forma alternativa, se pueden usar dos o más polinucleótidos en donde un polinucleótido puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica, por ejemplo, el dominio extracelular y el dominio transmembrana y otro polinucleótido puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica el módulo de señalización.

De acuerdo con un aspecto de algunos aspectos de la divulgación, se proporciona una construcción de ácido nucleico que comprende un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la molécula de algunos aspectos de la divulgación y un elemento regulador que actúa en *cis* para dirigir la transcripción del polinucleótido aislado en una célula hospedadora.

Por tanto, la expresión de ácidos nucleicos naturales o sintéticos que codifican el receptor de la superficie celular (p. ej., tg-TCR o molécula CAR) de la divulgación se logra normalmente mediante la unión operativa de un ácido nucleico que codifica el polipéptido o porciones del receptor de la superficie celular (p. ej., tg-TCR o CAR) del mismo a un elemento regulador que actúa en *cis* (p. ej., una secuencia promotora), y la incorporación de la construcción en un vector de expresión.

La construcción de ácido nucleico de la divulgación también puede incluir un potenciador, una secuencia de iniciación de la transcripción y la traducción, terminador de la transcripción y la traducción y, opcionalmente, una señal de poliadenilación, una LTR en 5', un sitio de unión de ARNt, una señal de empaquetamiento, un origen de la síntesis de la segunda cadena de ADN y una LTR en 3' o una porción de la misma; secuencias de polinucleótidos adicionales que permiten, por ejemplo, la traducción de varias proteínas a partir de un solo ARNm, como un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) y secuencias para la integración genómica del polipéptido promotor quimérico; secuencias diseñadas para aumentar la estabilidad, producción, purificación, rendimiento o toxicidad del péptido expresado.

Los potenciadores regulan la frecuencia de iniciación transcripcional. Normalmente, los elementos promotores están ubicados en la región de 30-110 pb en dirección 5' del sitio de inicio, aunque recientemente se ha visto que varios promotores también contienen elementos funcionales en dirección 3' del sitio de inicio. El espaciado entre los elementos promotores frecuentemente es flexible, de modo que la función del promotor se conserva cuando los elementos se invierten o mueven unos con respecto a otros. En el promotor de la timidina cinasa (tk), el espaciado entre los elementos promotores puede aumentarse hasta 50 pb entre sí antes de que la actividad empiece a disminuir.

Dependiendo del promotor, parece que elementos individuales pueden funcionar cooperativa o independientemente para activar la transcripción.

Un ejemplo de un promotor adecuado es la secuencia promotora temprana inmediata del citomegalovirus (CMV). Esta secuencia promotora es una secuencia promotora constitutiva fuerte capaz de impulsar altos niveles de expresión de cualquier secuencia polinucleotídica operativamente unida a la misma. Otro ejemplo de un promotor adecuado es el factor de crecimiento por elongación 1 alfa. (EF-1 alfa). Sin embargo, también se pueden usar otras secuencias promotoras constitutivas, que incluyen, pero sin limitarse al promotor temprano del virus del simio 40 (SV40), virus de tumor mamario de ratón (MMTV), promotor de la repetición terminal larga (LTR) del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), promotor MoMuLV, un promotor del virus de la leucemia aviar, un promotor temprano inmediato del virus de Epstein-Barr, un promotor del virus del sarcoma de Rous, así como promotores de genes humanos tales como, aunque no de forma limitativa, el promotor de actina, el promotor de miosina, el promotor de hemoglobina y el promotor de creatina cinasa. Además, la divulgación no debe limitarse al uso de promotores constitutivos. Los promotores inducibles también se contemplan como parte de la invención. El uso de un promotor inducible proporciona un interruptor molecular capaz de activar la expresión de la secuencia polinucleotídica a la que está unida operativamente cuando se desea dicha expresión, o desactivar la expresión cuando no se desea la expresión. Los ejemplos de promotores inducibles incluyen, pero no se limitan a un promotor de metalotioneína, un promotor de glucocorticoides, un promotor de progesterona y un promotor de tetraciclina.

El polinucleótido aislado de la divulgación se puede clonar en varios tipos de vectores. Por ejemplo, el polinucleótido aislado se puede clonar en un vector que incluye, pero sin limitación, un plásmido, un fagémido, un derivado de fago, un virus animal y un cósmido. Los vectores de particular interés incluyen vectores de expresión, vectores de replicación, vectores de generación de sondas y vectores de secuenciación.

Los ejemplos de vectores de expresión de mamífero incluyen, pero sin limitación, pcDNA3, pcDNA3.1(+/-), pGL3, pZeoSV2(+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, pSinRep5, DH26S, DHBB, pNMT1, pNMT41, pNMT81, que están comercializados por Invitrogen, pCI que está comercializado por Promega, pMbac, pPbac, pBK-RSV y pBK-CMV que están comercializados por Strategene, pTRES que está comercializado por Clontech y sus derivados.

También se pueden utilizar vectores de expresión que contienen elementos reguladores de virus eucariotas tales como retrovirus. Los vectores SV40 incluyen pSVT7 y pMT2. Los vectores procedentes del virus del papiloma bovino incluyen pBV-1MTHA, y los vectores procedentes del virus Epstein Bar incluyen pHEBO y p2O5. Otros vectores ilustrativos incluyen pMSG, pAV009/A<sup>+</sup>, pMTO10/A<sup>+</sup>, pMAMneo-5, baculovirus pDSVE, y cualquier otro vector que permita la expresión de proteínas bajo la dirección del promotor temprano SV-40, promotor posterior SV-40, promotor de metalotioneína, promotor del virus del tumor mamario murino, promotor del virus del sarcoma de Rous, promotor de polihedrina u otros promotores que se hayan mostrado eficaces para la expresión en células eucariotas.

Las técnicas de transferencia de ácidos nucleicos *in vivo* o *in vitro* actualmente preferidas incluyen la transfección con construcciones virales o no virales, tales como adenovirus, lentivirus, Virus del herpes simple 1, o virus adenoasociado (AAV). Los vectores virales recombinantes ofrecen ventajas como infección lateral y especificidad de direccionamiento. La introducción de ácidos nucleicos por infección viral ofrece varias ventajas sobre otros métodos como la lipofección y la electroporación, ya que se puede obtener una mayor eficiencia de transfección debido a la naturaleza infecciosa de los virus.

La tecnología de vectores virales es bien conocida en la técnica y se describe, por ejemplo, en Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York), y en otros manuales de virología y biología molecular. Los virus, que son útiles como vectores incluyen, pero sin limitación, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes y lentivirus. En general, un vector adecuado contiene un origen de replicación funcional en al menos un organismo, una secuencia promotor, sitios de endonucleasas de restricción convenientes, y uno o más marcadores seleccionables, (por ejemplo, los documentos WO 01/96584; WO 01/29058; y la patente de Estados Unidos N.º 6.326.193).

De acuerdo con algunos aspectos de la invención, la construcción de ácido nucleico de la divulgación es un vector viral.

Los vectores derivados de retrovirus tales como el lentivirus son herramientas adecuadas para lograr la transferencia de genes a largo plazo, ya que permiten la transferencia de genes a largo plazo, la integración estable de un transgén y su propagación en células hijas. Los vectores lentivirales tienen la ventaja añadida sobre los vectores procedentes de onco-retrovirus, tales como los virus de la leucemia murina, de que pueden transducir células que no proliferan, como los hepatocitos.

Es más, los vectores lentivirales ofrecen una mayor capacidad de inserción de genes y también tienen la ventaja añadida de una baja inmunogenicidad. De forma alternativa, pueden usarse vectores gamma-retrovirales. Los vectores gamma-retrovirales tienen una buena eficiencia de transducción y no tienen toxicidad asociada al vector [véase, p. ej., Zhang y Morgan, Adv Drug Deliv Rev. (2012) *supra*].

Por ejemplo, los retrovirus proporcionan una plataforma conveniente para los sistemas de administración de genes. Un gen seleccionado puede insertarse en un vector y empaquetarse en partículas retrovirales utilizando técnicas conocidas en la técnica. A continuación, el virus recombinante se puede aislar y administrar a las células del sujeto, ya sea *in vivo* o *ex-vivo*.

Para evaluar la expresión de un polipéptido del receptor de la superficie celular (por ejemplo, tg-TCR o CAR) o porciones del mismo, la construcción de ácido nucleico que se va a introducir en una célula también puede contener un gen marcador seleccionable o un gen indicador o ambos para facilitar la identificación y selección de células de expresión de la población de células que se busca transfectar o infectar a través de vectores virales. En otros aspectos, el marcador seleccionable puede llevarse en una porción separada de ADN y usarse en un procedimiento de cotransfección. Tanto los marcadores seleccionables como los genes indicadores pueden estar flanqueados por secuencias reguladoras apropiadas para permitir la expresión en las células del hospedador. Los marcadores seleccionables útiles incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos, tales como neo y similares.

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

Se pueden usar varios métodos para introducir la construcción de ácido nucleico de la divulgación en una célula hospedadora, por ejemplo, una célula de mamífero, bacteriana, de levadura o de insecto. Tales métodos se describen en general en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory, Nueva York (1989, 1992), en Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang et al., *Somatic Gene Therapy*, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega et al., *Gene Targeting*, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Butterworths, Boston Mass. (1988) y Gilboa et al. [*Biotechniques* 4 (6): 504-512, 1986] e incluyen, medios físicos, químicos o biológicos (por ejemplo, transfección estable o transitoria, lipofección, electroporación e infección con vectores virales recombinantes). Asimismo, véanse las patentes de EE.UU. números 5.464.764 y 5.487.992 para métodos de selección positiva-negativa.

Los métodos físicos para introducir un polinucleótido en una célula hospedadora incluyen la precipitación con fosfato de calcio, lipofección, bombardeo de partículas, microinyección, electroporación, y similares. Los métodos para producir células que comprenden vectores y/o ácidos nucleicos exógenos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. (2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York). Un método preferido para la introducción de un polinucleótido en una célula hospedadora es la transfección con fosfato de calcio.

Los medios químicos para introducir un polinucleótido en una célula hospedadora incluyen sistemas de dispersión coloidal, como complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, microesferas y sistemas basados en lípidos, incluidas emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Un sistema coloidal ilustrativo para su uso como vehículo de administración *in vitro* e *in vivo* es un liposoma (p. ej., una vesícula de membrana artificial).

Los métodos biológicos para introducir un polinucleótido de interés en una célula hospedadora incluyen el uso de vectores de ADN y ARN (como se ha descrito anteriormente). Los vectores virales, y especialmente los vectores retrovirales, se han convertido en el método más utilizado para insertar genes en mamíferos, por ejemplo, células humanas. Otros vectores virales pueden derivarse de lentivirus, poxvirus, virus del herpes simple 1, adenovirus y virus adenoasociados, y similares. Véase, por ejemplo, patentes de EE. UU. números 5.350.674 y 5.585.362.

En el caso de que se utilice un sistema de administración no viral, un vehículo de administración ilustrativo es un liposoma.

"Liposoma" es un término genérico que abarca una variedad de vehículos lipídicos simples y multilaminares formados por la generación de agregados o bicapas lipídicas encerradas. Los liposomas se pueden caracterizar por tener estructuras vesiculares con una membrana bicapa de fosfolípidos y un medio acuoso interno. Los liposomas multilamelares tienen múltiples capas lipídicas separadas por medio acuoso. Se forman espontáneamente cuando se suspenden fosfolípidos en un exceso de solución acuosa.

Los componentes lipídicos se reorganizan antes de la formación de estructuras cerradas, y atrapan agua y solutos disueltos entre las bicapas lipídicas (Ghosh et al., 1991 *Glycobiology* 5: 505-10). Sin embargo, también se incluyen composiciones que tienen estructuras diferentes en solución que la estructura vesicular normal. Por ejemplo, los lípidos pueden adoptar una estructura micelar o simplemente existir como agregados no uniformes de moléculas lipídicas. También se contemplan los complejos de lipofectamina-ácido nucleico.

Se contempla el uso de formulaciones lipídicas para la introducción de los ácidos nucleicos en una célula hospedadora (*in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*). En otro aspecto, el ácido nucleico puede estar asociado con un lípido. El ácido nucleico asociado a un lípido puede encapsularse en el interior acuoso de un liposoma, intercalarse dentro de la bicapa lipídica de un liposoma, unirse a un liposoma a través de una molécula de enlace que está asociada tanto con el liposoma como con el oligonucleótido, atraparse en un liposoma, formar un complejo con un liposoma, dispersarse en una solución que contiene un lípido, mezclarse con un lípido, combinarse con un lípido, estar contenido como una suspensión en un lípido, estar contenido o formando un complejo con una micela, o asociarse de otro modo con un lípido. Las composiciones asociadas a lípido, lípido/ADN o lípido/vector de expresión no se limitan a ninguna estructura particular en solución. Por ejemplo, pueden estar presentes en una estructura bicapa, como micelas, o con una estructura "colapsada". También pueden estar simplemente entremezcladas en una solución, posiblemente formando agregados que no son uniformes en tamaño o forma. Los lípidos son sustancias grasas que pueden ser lípidos naturales o sintéticos. Por ejemplo, los lípidos incluyen las gotitas de grasa que se encuentran de forma natural en el citoplasma, así como la clase de compuestos que contienen hidrocarburos alifáticos de cadena larga y sus derivados, tal como ácidos grasos, alcoholes, aminas, amino alcoholes y aldehídos.

Los lípidos adecuados para su uso se pueden obtener de fuentes comerciales. Por ejemplo, la dimiristil fosfatidilcolina ("DMPC") se puede obtener en Sigma, St. Louis, Mo.; el fosfato de dicetilo ("DCP") se puede obtener en K & K Laboratories (Plainview, N.Y.); el colesterol ("Choi") se puede obtener en Calbiochem-Behring; el dimiristil fosfatidilglicerol ("DM-PG"); y otros lípidos se pueden obtener en Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, Ala.). Adicionalmente, o como alternativa, se pueden usar los lípidos DOTMA, DOPE y DC-Chol [Tonkinson et al., *Cancer Investigation*, 14(1): 54-65 (1996)]. Las soluciones madre de lípidos en cloroformo o cloroformo/metanol se pueden almacenar a aproximadamente -20 °C. El cloroformo se usa como único disolvente ya que se evapora más fácilmente que el metanol.

Otro sistema de administración no viral ilustrativo que se puede usar de acuerdo con la presente divulgación es un sistema de administración de genes no virales basado en transposones, como p. ej., Sleeping Beauty o PiggyBac.

Independientemente del método utilizado para introducir ácidos nucleicos exógenos en una célula hospedadora, para confirmar la presencia de la secuencia de ADN recombinante en la célula hospedadora, se puede realizar una variedad de ensayos. Tales ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos de "biología molecular" bien conocidos por los expertos en la materia, como transferencia Southern y Northern, RT-PCR y PCR; ensayos "bioquímicos", tales como la detección de la presencia o ausencia de un péptido particular, por ejemplo, por medios inmunológicos (ELISA y transferencias Western) o mediante ensayos descritos en el presente documento para identificar agentes que entran dentro del alcance de la invención.

Se apreciará que la célula transducida con el receptor de la superficie celular (p. ej., tg-TCR y/o CAR) puede modificarse genéticamente adicionalmente para reprimir la expresión de al menos un gen de punto de control inmunitario endógeno en la célula.

El gen del punto de control inmunitario puede comprender un gen PD o CTLA.

Como se usa en el presente documento, la expresión "gen de punto de control inmunitario" se refiere a cualquier gen que esté involucrado en un proceso inhibitor (p. ej., bucle de retroalimentación) que actúa para regular la amplitud de una respuesta inmunitaria, por ejemplo, un bucle de retroalimentación inhibitor inmunitario que mitiga la propagación descontrolada de respuestas inmunitarias dañinas.

Los ejemplos no limitativos de genes de puntos de control inmunitario incluyen miembros de la familia ampliada de receptores CD28 y sus ligandos, así como genes implicados en vías co-inhibitorias (p. ej., CTLA-4 y PD-1).

Por tanto, de acuerdo con un aspecto, se pueden utilizar nucleasas o represores de transcripción dirigidos a PD1 y/o CTLA-4 como se describe en la solicitud de patente de EE. UU. N.º 20140120622.

Adicionalmente, o como alternativa, las proteínas de punto de control inmunitario, que regulan la activación o función de un linfocito T, incluyendo, por ejemplo, PD1, PDL-1, B7H2, B7H4, CTLA-4, CD80, CD86, LAG-3, TIM-3, KIR, IDO, CD19, OX40, 4-1BB (CD137), CD27, CD70, CD40, GITR, CD28 y/o ICOS (CD278), pueden modularse (por ejemplo, regularse al alza o a la baja según sea necesario) en la célula transducida mediante el uso de un regulador del punto de control inmunitario.

De acuerdo con aspectos específicos, el regulador del punto de control inmunitario se selecciona del grupo que consiste en anti-CTLA4, anti-PD-1, anti-PDL-1, agonista de CD40, agonista de 4-1BB, agonista de GITR y agonista

de OX40.

De acuerdo con un aspecto de algunos aspectos de la divulgación, se proporciona una población aislada de células que comprende la célula aislada de algunos aspectos de la invención.

La célula aislada o la población de células de algunos aspectos de la divulgación se pueden administrar a un organismo *per se*, o en una composición farmacéutica donde se mezcla con vehículos o excipientes adecuados.

Como se usa en el presente documento, una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los principios activos descritos en el presente documento con otros componentes químicos tales como vehículos y excipientes fisiológicamente adecuados. El fin de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

En el presente documento, la expresión "principio activo" se refiere a las células de algunos aspectos de la descripción responsables del efecto biológico.

En lo sucesivo en el presente documento, las expresiones "vehículo fisiológicamente aceptable" y "vehículo farmacéuticamente aceptable", que pueden usarse indistintamente, se refieren a un vehículo o un diluyente que no provoca irritación significativa a un organismo y no anula la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado. En estas expresiones se incluye un adyuvante.

En el presente documento el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un principio activo. Los ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

Pueden encontrarse técnicas para la formulación y administración de fármacos en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, Pensilvania, última edición.

Las vías de administración adecuadas pueden, por ejemplo, incluir la administración oral, rectal, transmucosa, especialmente transnasal, intestinal o parenteral, incluyendo las inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares, así como intratecales, intraventricular directa, intracardiaca, por ejemplo, en la cavidad ventricular derecha o izquierda, en la arteria coronaria común, intravenosa, intraperitoneal, intranasal o intraocular.

Los enfoques convencionales para la administración de fármacos al sistema nervioso central (SNC) incluyen: estrategias neuroquirúrgicas (por ejemplo, inyección intracerebral o infusión intracerebroventricular); manipulación molecular del agente (por ejemplo, producción de una proteína de fusión química que comprende un péptido de transporte que tiene una afinidad por una molécula de superficie celular endotelial en combinación con un agente que en sí mismo es incapaz de cruzar la BHE) en un intento de aprovechar una de las rutas de transporte endógenas de la BHE; estrategias farmacológicas diseñadas para aumentar la solubilidad en lípidos de un agente (por ejemplo, conjugación de agentes hidrosolubles con transportadores lipídicos o de colesterol); y la alteración transitoria de la integridad de la BHE mediante alteración hiperosmótica (que es el resultado de la infusión de una solución de manitol en la arteria carótida o del uso de un agente biológicamente activo tal como un péptido de angiotensina). Sin embargo, cada una de estas estrategias tiene limitaciones, tales como los riesgos intrínsecos asociados con un procedimiento quirúrgico invasivo, una limitación de tamaño impuesta por una limitación intrínseca a los sistemas de transporte endógeno, efectos secundarios biológicos potencialmente indeseables asociados con la administración sistémica de una molécula química compuesta por un motivo transportador que podría estar activo fuera del SNC y el posible riesgo de daño cerebral dentro de las regiones del cerebro donde se altera la BHE, lo que lo convierte en un método de administración deficiente.

Como alternativa, puede administrarse la composición farmacéutica de una manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, mediante inyección de la composición farmacéutica directamente en una región tisular de un paciente.

De acuerdo con un aspecto, la vía de administración incluye, por ejemplo, una inyección, ingestión, transfusión, implante o trasplante. Las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse a un paciente por vía subcutánea, intradérmica, intratumoral, intraganglionar, intramedular, intramuscular, por inyección intravenosa (i.v.), o por vía intraperitoneal. En un aspecto, la composición farmacéutica de la presente divulgación se administra a un paciente mediante inyección intradérmica o subcutánea. En otro aspecto, la composición farmacéutica de la presente divulgación se administra preferentemente mediante inyección i.v. La composición farmacéutica se puede inyectar directamente en un tumor, ganglio linfático o sitio de infección.

Las composiciones farmacéuticas de algunos aspectos de la divulgación pueden fabricarse mediante procesos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, preparación de grageas, levitación, emulsionado, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

Las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con algunos aspectos de la divulgación pueden formularse

de esta forma de manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y adyuvantes, que facilitan el procesamiento de los principios activos en preparaciones que, pueden usarse farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida.

5 Para inyección, los principios activos de la composición farmacéutica pueden formularse en soluciones acuosas, preferentemente, en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón salino fisiológico. Para la administración transmucosa, se usan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera a permear. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica.

10 Para administración oral, la composición farmacéutica puede formularse fácilmente combinando el compuesto activo con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales vehículos permiten que la composición farmacéutica se formule como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones y similares, para la ingesta oral por un paciente. Pueden prepararse preparaciones farmacológicas para su uso oral usando un excipiente sólido, opcionalmente moliendo la mezcla resultante y procesando la mezcla para gránulos, después de añadir auxiliares adecuados si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Son excipientes adecuados, en particular, cargas, tales como azúcares, entre las que se incluyen lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carbometilcelulosa de sodio; y/o polímeros fisiológicamente aceptables tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden añadirse agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido alginico o una sal del mismo, tal como alginato de sodio.

25 Los núcleos de grageas se proporcionan con recubrimientos adecuados. Para este fin, pueden usarse soluciones concentradas de azúcar que opcionalmente pueden contener goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos o mezclas de disolventes adecuados. Pueden añadirse colorantes o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de grageas para la identificación o para caracterizar distintas combinaciones de dosis de compuestos activos.

30 Las composiciones farmacéuticas que se pueden usar por vía oral, incluyen cápsulas de encaje a presión hechas de gelatina, así como cápsulas blandas selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste por presión pueden contener los principios activos en mezcla con una carga tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones, lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los principios activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Asimismo, pueden añadirse estabilizantes. 35 Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosificaciones adecuadas para la vía de administración elegida.

Para administración bucal, las composiciones pueden adoptar la forma de comprimidos o grageas formulados de forma convencional.

40 Para la administración mediante inhalación nasal, los principios activos para su uso de acuerdo con algunos aspectos de la divulgación se suministran convenientemente en forma de una presentación de pulverización en aerosol de un envase presurizado o un nebulizador con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, dicloro-tetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse dotándolo de una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina, para su uso en un dosificador pueden formularse conteniendo una mezcla de polvo del compuesto y una base de polvo adecuada, tal como lactosa o almidón.

50 La composición farmacéutica descrita en el presente documento puede formularse para administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección intravenosa rápida o infusión continua.

Las formulaciones para inyección pueden presentarse en una forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis con, opcionalmente, un conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos y pueden comprender agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

60 Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación de principio activo en forma hidrosoluble. Adicionalmente, pueden prepararse suspensiones de los principios activos como suspensiones para inyección de base oleaginosa o acuosa apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas.

65 Las suspensiones de inyección acuosas pueden contener sustancias, que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que aumenten la solubilidad de los principios activos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

De forma alternativa, el principio activo puede estar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, solución basada en agua estéril, apirógena, antes de su uso.

- 5 La composición farmacéutica de algunos aspectos de la divulgación también puede formularse en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, usando, por ejemplo, bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

10 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en el contexto de la divulgación incluyen composiciones en donde los principios activos están contenidos en una cantidad eficaz para lograr el fin pretendido. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de principios activos eficaces para prevenir, aliviar o mejorar síntomas de una patología o prolongar la supervivencia del sujeto que se está tratando.

15 La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz se encuentra dentro de la capacidad de los expertos en la materia, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.

20 Cuando se indica "cantidad terapéutica", la cantidad precisa de las composiciones de la presente divulgación que se administrarán se puede determinar por un médico teniendo en cuenta las diferencias individuales de edad, peso, patología, p.ej. tamaño del tumor, extensión de la infección o metástasis, y la condición del paciente (sujeto). En general, se puede afirmar que una composición farmacéutica que comprende las células descritas en el presente documento se puede administrar a una dosis de  $10^4$  a  $10^9$  células/kg de peso corporal, incluyendo todos los valores enteros dentro de esos intervalos.

25 Por ejemplo, el número de células infundidas a un receptor debe ser superior a  $1 \times 10^4$ /kg de peso corporal. El número de células infundidas a un receptor normalmente debe estar en el intervalo de  $1 \times 10^3$ /kg de peso corporal a  $1 \times 10^4$ /kg de peso corporal, intervalo de  $1 \times 10^4$ /kg de peso corporal a  $1 \times 10^5$ /kg de peso corporal, intervalo de  $1 \times 10^4$ /kg de peso corporal a  $1 \times 10^6$ /kg de peso corporal, intervalo de  $1 \times 10^4$  /kg de peso corporal a  $10 \times 10^7$ /kg de peso corporal, intervalo de  $1 \times 10^4$ /kg de peso corporal a  $1 \times 10^8$  /kg de peso corporal, intervalo de  $1 \times 10^3$ /kg de peso corporal a  $1 \times 10^5$ /kg de peso corporal, intervalo de  $1 \times 10^4$ /kg de peso corporal a  $1 \times 10^6$ /kg de peso corporal, intervalo de  $1 \times 10^6$ /kg de peso corporal a  $10 \times 10^7$ /kg de peso corporal, intervalo de  $1 \times 10^5$  /kg de peso corporal a  $10 \times 10^7$ /kg de peso corporal, intervalo de  $1 \times 10^6$ /kg de peso corporal a  $1 \times 10^8$ /kg de peso corporal, o intervalo de  $1 \times 10^6$ /kg de peso corporal a  $1 \times 10^9$ /kg de peso corporal. De acuerdo con un aspecto específico, el número de células infundidas a un receptor debe estar en el intervalo de  $1 \times 10^6$ /kg de peso corporal a  $10 \times 10^8$ /kg de peso corporal.

35 Las composiciones celulares de algunos aspectos de la divulgación también pueden administrarse múltiples veces en estas dosis. Las células se pueden administrar usando técnicas de infusión que se conocen comúnmente en inmunoterapia (véase, por ejemplo, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988). Un experto en la materia de la medicina puede determinar fácilmente la dosificación y el régimen de tratamiento óptimos para un paciente particular mediante el seguimiento del paciente en busca de signos de enfermedad y ajustando el tratamiento en consecuencia.

45 Por ejemplo, el efecto de los principios activos (p. ej., las células de algunos aspectos de la invención) sobre la patología puede evaluarse controlando el nivel de marcadores, por ejemplo, hormonas, glucosa, péptidos, hidratos de carbono, etc. en una muestra biológica del sujeto tratado utilizando métodos bien conocidos (por ejemplo, ELISA, FACS, etc) o controlando el tamaño del tumor utilizando métodos bien conocidos (por ejemplo, ultrasonido, TC, RM, etc.).

50 Para cualquier preparación utilizada en los métodos de la invención, la cantidad o dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular e *in vitro*. Por ejemplo, puede formularse una dosis en modelos animales para conseguir una concentración o un título deseado. Dicha información puede usarse para determinar de forma más precisa las dosis útiles en seres humanos.

55 La toxicidad y la eficacia terapéutica de los principios activos descritos en el presente documento pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales *in vitro*, en cultivos celulares o animales experimentales. Los datos obtenidos de estos ensayos *in vitro* y de cultivo celular y estudios animales pueden utilizarse en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en el ser humano.

60 La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación pueden ser elegidas por el médico individual a la vista del estado del paciente. (Véase, p. ej., Fingl, *et al.*, 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", cap. 1 pág. 1).

65 La cantidad y el intervalo de dosificación pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles del principio activo que sean suficientes para inducir o suprimir el efecto biológico (concentración eficaz mínima, CEM). La CEM variará para cada preparación, pero puede estimarse a partir de datos *in vitro*. Las dosificaciones necesarias para lograr la CEM dependerán de las características individuales y de la vía de administración. Pueden usarse ensayos

de detección para determinar las concentraciones plasmáticas.

Dependiendo de la gravedad y el grado de respuesta de la afección a tratar, la dosificación puede ser de una única administración o una pluralidad de administraciones, durando el ciclo de tratamiento de varios días a varias semanas o hasta que se efectúe la curación o se logre la disminución de la patología.

La cantidad de una composición a administrar será, por supuesto, dependiente del sujeto que se esté tratando, la gravedad de la afección, la forma de administración, el criterio del médico que la receta, etc.

De acuerdo con algunos aspectos de la invención, el agente terapéutico de la divulgación se puede proporcionar al sujeto junto con otro(s) fármaco(s) diseñado(s) para tratar la patología [terapia de combinación, (por ejemplo, antes, simultáneamente o después)].

En ciertos aspectos de la presente invención, las células de algunos aspectos de la divulgación se administran a un paciente junto con cualquier número de modalidades de tratamiento relevantes, incluyendo pero sin limitarse al tratamiento con agentes tales como agentes antivirales (por ejemplo, ganciclovir, valaciclovir, aciclovir, valganciclovir, foscarnet, cidofovir, maribavir, leflunomida); agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, agentes antineoplásicos, tales como, entre otros, agentes alquilantes que incluyen, p. ej., ciclofosfamida, busulfán, mecloretamina o mostina (HN2), uramustina o mostaza de uracilo, melfalán, clorambucilo, ifosfamida, bendamustina, nitrosoureas carmustina, lomustina, estreptozocina, tiotepa, cisplatino, carboplatino, nedaplatino, oxaliplatino, satraplatino, triplatinato tetranitrato, procarbazona, altretamina, triacenos (dacarbazina, mitozolomida, temozolomida), dacarbazina, temozolomida, Myleran, Busulfex, fludarabina, dimetilmilerano o citarabina); agentes para el tratamiento de la EM (por ejemplo, natalizumab); o agentes para el tratamiento de la psoriasis (por ejemplo, efalizumab).

En aspectos adicionales, las células de algunos aspectos de la divulgación pueden usarse en combinación con quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores (por ejemplo, ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506), anticuerpos u otros agentes inmunosupresores (descritos con más detalle a continuación).

En un aspecto adicional, las composiciones de células de algunos aspectos de la divulgación se administran a un paciente junto con (por ejemplo, antes, simultáneamente o después de) un trasplante de médula ósea.

En un aspecto adicional, las composiciones de células de algunos aspectos de la divulgación se administran a un paciente después de una terapia de ablación de linfocitos T usando, por ejemplo, agentes de quimioterapia tales como, fludarabina, radioterapia de haz externo (XRT), ciclofosfamida o anticuerpos, tales como OKT3 o CAMPATH.

En otro aspecto, las composiciones de células de la presente divulgación se administran después de la terapia ablativa de linfocitos B, tales como agentes que reaccionan con CD20, por ejemplo, Rituxan.

La terapia de combinación puede aumentar el efecto terapéutico del agente de la divulgación en el sujeto tratado.

Las composiciones de algunos aspectos de la divulgación pueden, si se desea, presentarse en un envase o dispositivo dosificador, tal como un kit aprobado por la FDA, que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el principio activo. El envase puede, por ejemplo, comprender papel metálico o de plástico, tal como un envase de tipo blíster. El envase o dispositivo dosificador puede estar acompañado de instrucciones para la administración. El envase o dosificador también puede estar acompañado de una nota asociada con el recipiente en una forma prescrita por un organismo público que regule la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos, reflejando dicha nota la aprobación por parte del organismo de la forma de las composiciones o la administración humana o veterinaria. Dicha nota, por ejemplo, puede ser un etiquetado aprobado por la Administración de Fármacos y Alimentos de EE. UU. para fármacos con receta o un prospecto de producto aprobado. Además, pueden prepararse composiciones que comprenden una preparación de la divulgación formulada en un vehículo farmacéutico compatible, colocarse en un recipiente adecuado y marcarse para el tratamiento de una afección indicada, como se ha detallado anteriormente de manera adicional.

El kit puede, por ejemplo, comprender papel metálico o de plástico, tal como un envase de tipo blíster. El envase o dispositivo dosificador puede estar acompañado de instrucciones para la administración. El envase o dosificador también puede estar acompañado de una nota asociada con el recipiente en una forma prescrita por un organismo público que regule la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos, reflejando dicha nota la aprobación por parte del organismo de la forma de las composiciones o la administración humana o veterinaria. Dicha nota, por ejemplo, puede ser un etiquetado aprobado por la Administración de Fármacos y Alimentos de EE. UU. para fármacos con receta o un prospecto de producto aprobado. Además, pueden prepararse composiciones que comprenden una preparación de la divulgación formulada en un vehículo farmacéutico compatible, colocarse en un recipiente adecuado y marcarse para el tratamiento de una afección indicada, como se ha detallado anteriormente de manera adicional.

De acuerdo con un aspecto, el kit comprende además un agente quimioterapéutico (p. ej., un agente antineoplásico, como se ha descrito en detalle anteriormente).

De acuerdo con un aspecto, el kit comprende además un agente antiviral (como se ha descrito en detalle anteriormente).

De acuerdo con un aspecto que no forma parte de la invención, se proporciona un método para tratar una enfermedad en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la población de células de algunos aspectos de la invención, tratando de esta manera al sujeto.

De acuerdo con un aspecto de algunos aspectos de la invención, se proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de la población de células de algunos aspectos de la divulgación para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un sujeto que lo necesite.

El término "tratar" se refiere a inhibir, prevenir o detener el desarrollo de una patología (enfermedad, trastorno o afección) y/o provocar la reducción, remisión o regresión de una patología. Los expertos en la materia entenderán que pueden usarse diversas metodologías y ensayos para evaluar el desarrollo de una patología y, de manera similar, pueden utilizarse diversas metodologías y ensayos para evaluar la reducción, remisión o regresión de una patología.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" incluye mamíferos, preferentemente seres humanos de cualquier edad o sexo que padezcan la patología.

La patología puede ser, pero sin limitación, una enfermedad maligna (cáncer), una enfermedad infecciosa (por ejemplo, infección viral, infección bacteriana, infección fúngica, infección por protozoos o infecciones parasitarias), una alergia y/o una enfermedad autoinmunitaria.

#### *Enfermedades cancerosas*

Las enfermedades malignas (también denominadas cánceres) que pueden tratarse mediante el método de algunos aspectos de la divulgación pueden ser cualquier tumor sólido o no sólido y/o metástasis tumoral.

Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas, sarcoma de partes blandas, sarcoma de Kaposi, melanoma, cáncer de pulmón (incluyendo cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma epidermoide de pulmón), cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago (incluyendo cáncer gastrointestinal), cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer rectal, carcinoma de endometrio o uterino, carcinoma carcinoide, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, mesotelioma, mieloma múltiple, trastorno linfoproliferativo postrasplante (PTLD), y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello (por ejemplo, tumor cerebral). Las afecciones cancerosas susceptibles de tratamiento de la divulgación incluyen cánceres metastásicos.

De acuerdo con un aspecto, la enfermedad maligna es una neoplasia hematológica. Las neoplasias hematológicas ilustrativas incluyen, pero sin limitación, leucemia [por ejemplo, linfática aguda, linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica aguda de linfocitos pre-B, leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T, aguda - megacarioblástica, monocítica, mielógena aguda, mielóide aguda, mielóide aguda con eosinofilia, de linfocitos B, basófila, mielóide crónica, crónica, de linfocitos B, eosinofílica, de Friend, granulocítica o mielocítica, de células pilosas, linfocítica, megacarioblástica, monocítica, monocítica/macrófagos, mieloblástica, mielóide, mielomonocítica, de plasmocitos, de linfocitos pre-B, promielocítica, subaguda, de linfocitos T, neoplasia linfoide, predisposición a la malignidad mielóide, leucemia no linfocítica aguda, leucemia linfocítica aguda de linfocitos T (LLA-T) y leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (LLC-B)] y linfoma [p. ej., enfermedad de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, de Burkitt, cutáneo de linfocitos T, histiocítico, linfoblástico, de linfocitos T, tímico, de linfocitos B, incluyendo bajo grado/folicular; NHL linfocítico de células pequeñas (SL); NHL de grado intermedio/folicular; NHL difuso de grado intermedio; NHL inmunoblástico de alto grado; NHL linfoblástico de alto grado; NHL de células no escindidas pequeñas de alto grado; NHL con neoplasia maligna; linfoma de células del manto; linfoma relacionado con SIDA; y macroglobulinemia de Waldenström].

De acuerdo con un aspecto específico, la enfermedad maligna es una leucemia, un linfoma, un mieloma, un melanoma, un sarcoma, un neuroblastoma, un cáncer de colon, un cáncer colorrectal, un cáncer de mama, un cáncer de ovario, un cáncer de esófago, un cáncer de células sinoviales o un cáncer de páncreas.

De acuerdo con algunos aspectos de la invención, la patología es un tumor sólido. De acuerdo con algunos aspectos de la invención, la patología es una metástasis tumoral. De acuerdo con algunos aspectos de la invención, la patología es una neoplasia hematológica.

De acuerdo con algunos aspectos de la invención, la patología es una leucemia o un linfoma.

Se enumeran ejemplos de enfermedades malignas que son tratables mediante los métodos de algunos aspectos de la divulgación en las Tablas 1 y 2, a continuación.

Tabla 1: Aplicaciones clínicas que utilizan células transducidas con tg-TCR con regímenes de preacondicionamiento opcionales

Ag diana de tg-TCR	Enfermedad	Preacondicionamiento
MART-1	melanoma	Cy + Flud (ciclofosfamida + fludarabina)
MART-1	melanoma	Cy + Flud
gp100	melanoma	Cy + Flud
p53/gp100	cáncer de mama melanoma cáncer de esófago	Cy + Flud
CEA	cáncer colorrectal	Cy + Flud
NY-ESO-1	melanoma cáncer de células sinoviales	Cy + Flud
MAGE-A3	melanoma cáncer de células sinoviales cáncer de esófago	Cy + Flud
MAGE-A3	melanoma mieloma	Cy  Melfalán y autotrasplante de células madre (SCT)

(adaptado de Fujiwara, Pharmaceuticals (2014), 7: 1049-1068)

5      Tabla 2: Aplicaciones clínicas que utilizan células transducidas con CAR con regímenes de preacondicionamiento opcionales

Ag diana de CAR	Enfermedad	Preacondicionamiento
Molécula de adhesión de células L1	neuroblastoma	ninguno
HER2	cáncer de colon con metástasis de pulmón/hígado	Cy + Flud
GD2	neuroblastoma	ninguno
CD 19	leucemia linfocítica crónica (CLL)	CTx para CLL
CD19	CLL leucemia linfocítica aguda (ALL)	ninguno Cy (1500 mg o 3000 mg)
CD19	CLL linfoma de células foliculares (FL)	Cy + Flud
CD 19	leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B (B-ALL)	Cy (1500 mg o 3000 mg)
CD 19	ALL	CTx para ALL
CD 19	B-ALL ph+ resistente	Cy (1500 mg o 3000 mg)
CD20	linfoma de células del manto (MCL)	Cy (1000 mg/m <sup>2</sup> )
	FL	

(adaptado de Fujiwara, Pharmaceuticals (2014), 7: 1049-1068)

De acuerdo con un aspecto específico, la enfermedad maligna es una leucemia, un linfoma, un mieloma, un melanoma, un sarcoma, un neuroblastoma, un cáncer de colon, un cáncer colorrectal, un cáncer de mama, un cáncer de ovario, un cáncer de esófago, un cáncer de células sinoviales y un cáncer de páncreas.

#### Enfermedades infecciosas

Los ejemplos de enfermedades infecciosas incluyen, pero sin limitación, enfermedades infecciosas crónicas, enfermedades infecciosas subagudas, enfermedades infecciosas agudas, enfermedades víricas, enfermedades bacterianas, enfermedades por protozoos, enfermedades parasitarias, enfermedades fúngicas, enfermedades por micoplasma y enfermedades por priones.

Los tipos específicos de patógenos virales que causan enfermedades infecciosas tratables de acuerdo con las enseñanzas de la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, retrovirus, circovirus, parvovirus, papovavirus, adenovirus, herpesvirus, iridovirus, poxvirus, hepadnavirus, picornavirus, calicivirus, togavirus, flavivirus, reovirus, ortomixovirus, paramixovirus, rabdovirus, bunyavirus, coronavirus, arenavirus y filovirus.

Los ejemplos específicos de infecciones virales que pueden tratarse de acuerdo con las enseñanzas de la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), virus de la gripe, infección por rinovirus, meningitis vírica, infección por virus de Epstein Barr (EBV), infección por virus de la hepatitis A, B o C, sarampión, infección por el virus del papiloma/verrugas, infección por citomegalovirus (CMV), infecciones por el virus *Herpes simplex*, fiebre amarilla, infección por el virus del Ébola y rabia.

De acuerdo con un aspecto específico, la enfermedad viral se selecciona del grupo que consiste en una infección por el virus de la inmunodeficiencia (VIH), virus de la gripe, citomegalovirus (CMV), virus de la leucemia de linfocitos T tipo 1 (TAX), virus de la hepatitis C (VHC) y virus de la hepatitis B (VHB).

## 5 *Enfermedades alérgicas*

Ejemplos de enfermedades alérgicas incluyen, pero sin limitación, asma, urticaria, urticaria, alergia al polen, alergia a los ácaros del polvo, alergia al veneno, alergia a los cosméticos, alergia al látex, alergia química, alergia a fármacos, alergia a las picaduras de insectos, alergia a la caspa animal, alergia a las plantas urticantes, alergia a la hiedra venenosa y alergia alimentaria.

## *Enfermedades autoinmunitarias*

Incluyen, pero sin limitación, enfermedades cardiovasculares, enfermedades reumáticas, enfermedades glandulares, gastroenteropatías, enfermedades cutáneas, enfermedades hepáticas, enfermedades neurológicas, enfermedades musculares, enfermedades nefríticas, enfermedades relacionadas con la reproducción, enfermedades del tejido conjuntivo y enfermedades sistémicas.

Los ejemplos de enfermedades cardiovasculares autoinmunitarias incluyen, pero sin limitación, aterosclerosis (Matsuura E. *et al.*, Lupus. 1998;7 Supl. 2:S135), infarto de miocardio (Vaarala O. Lupus. 1998;7 Supl. 2:S132), trombosis (Tincani A. *et al.*, Lupus 1998;7 Supl. 2:S 107-9), granulomatosis de Wegener, arteritis de Takayasu, síndrome de Kawasaki (Praprotnik S. *et al.*, Wien Klin Wochenschr 25 de agosto de 2000;112 (15-16):660), enfermedad autoinmunitaria anti-factor VIII (Lacroix-Desmazes S. *et al.*, Semin Thromb Hemost.2000;26 (2):157), vasculitis necrosante de vasos pequeños, poliangeitis microscópica, síndrome de Churg y Strauss, glomerulonefritis necrosante focal pauci-inmunitaria y con semilunas (Noel LH. Ann Med Interne (París). mayo de 2000;151 (3): 178), síndrome antifosfolípido (Flamholz R. *et al.*, J Clin Apheresis 1999;14 (4):171), insuficiencia cardíaca inducida por anticuerpos (Wallukat G. *et al.*, Am J Cardiol. 17 de junio de 1999;83 (12A):75H), púrpura trombocitopénica (Moccia F. Ann Ital Med Int. abril-junio de 1999;14 (2):114); Semple JW. *et al.*, Blood 15 de mayo de 1996;87(10):4245), anemia hemolítica autoinmunitaria (Efremov DG. *et al.*, Leuk Lymphoma 1998 Jan;28(3-4):285; Sallah S. *et al.*, Ann Hematol marzo de 1997;74 (3):139), autoinmunidad cardíaca en la enfermedad de Chagas (Cunha-Neto E. *et al.*, J Clin Invest 15 de octubre de 1996; 98 (8): 1709) y autoinmunidad anti-linfocitos T cooperadores (Caporossi AP. *et al.*, Viral Immunol 1998; 11 (1):9).

Los ejemplos de enfermedades reumáticas autoinmunitarias incluyen, pero no se limitan a artritis reumatoide (Krenn V. *et al.*, Histol Histopathol (2000) 15 (3):791; Tisch R y McDevitt HO. Proc Natl Acad Sci USA (1994) 18; 91(2): 437-438] y espondilitis anquilosante [Jan Voswinkel *et al.*, Arthritis Res (2001) 3 (3): 189].

Los ejemplos de enfermedades glandulares autoinmunitarias incluyen, pero sin limitación, enfermedad pancreática, diabetes de tipo I, enfermedad tiroidea, enfermedad de Graves, tiroiditis, tiroiditis autoinmunitaria espontánea, tiroiditis de Hashimoto, mixedema idiopático, autoinmunidad ovárica, infertilidad autoinmunitaria anti-espermatozoides, prostatitis autoinmunitaria y síndrome poliglandular autoinmunitario de tipo I. Las enfermedades incluyen, pero sin limitación, enfermedades autoinmunitarias del páncreas, diabetes de tipo 1 (Castano L. y Eisenbarth GS. Ann. Rev. Immunol. 8:647; Zimmet P. Diabetes Res Clin Pract octubre de 1996;34 Suppl:S125), enfermedades autoinmunitarias tiroideas, enfermedad de Graves (Orgiazzi J. Endocrinol Metab Clin North Am junio de 2000;29 (2): 339; Sakata S. *et al.*, Mol Cell Endocrinol marzo de 1993;92 (1):77), tiroiditis autoinmunitaria espontánea (Braley-Mullen H. y Yu S, J Immunol 15 de diciembre de 2000;165 (12):7262), tiroiditis de Hashimoto (Toyoda N. *et al.*, Nippon Rinsho agosto de 1999; 57 (8):1810), mixedema idiopático (Mitsuma T. Nippon Rinsho. agosto de 1999; 57 (8):1759), autoinmunidad ovárica (Garza KM. *et al.*, J Reprod Immunol febrero de 1998;37 (2):87), infertilidad autoinmunitaria anti-espermatozoides (Diekman AB. *et al.*, Am J Reprod Immunol. marzo de 2000;43-3): 134), prostatitis autoinmunitaria (Alexander RB. *et al.*, Urology diciembre de 1997;50 (6): 893) y síndrome poliglandular autoinmunitario de Tipo I (Hara T. *et al.*, Blood. 1 de marzo de 1991;77 (5):1127).

Los ejemplos de enfermedades gastrointestinales autoinmunitarias incluyen, pero sin limitación, enfermedades inflamatorias intestinales crónicas (Garcia Herola A. *et al.*, Gastroenterol Hepatol. enero de 2000;23 (1):16) enfermedad celíaca (Landau YE. y Shoenfeld Y. Harefuah 16 de enero de 2000;138 (2):122), colitis, ileítis y enfermedad de Crohn.

Los ejemplos de enfermedades cutáneas autoinmunitarias incluyen, pero sin limitación, enfermedades cutáneas ampollas autoinmunitarias, tal como, pero sin limitación, pénfigo vulgar, penfigoide ampolloso y pénfigo foliáceo.

Los ejemplos de enfermedades hepáticas autoinmunitarias incluyen, pero sin limitación, hepatitis, hepatitis activa crónica autoinmunitaria (Franco A. *et al.*, Clin Immunol Immunopathol marzo de 1990;54(3):382), cirrosis biliar primaria (Jones DE). Clin Sci (Colch) noviembre de 1996;91 (5):551; Strassburg CP. *et al.*, Eur J Gastroenterol Hepatol. junio de 1999;11 (6):595) y hepatitis autoinmunitaria (Manns MP. J Hepatol agosto de 2000;33 (2):326).

Los ejemplos de enfermedades neurológicas autoinmunitarias incluyen, pero sin limitación, esclerosis múltiple (Cross

AH. *et al.*, J Neuroimmunol 1 enero de 2001;112 (1-2):1), enfermedad de Alzheimer (Oron L. *et al.*, J Neural Transm Supl. 1997;49:77), miastenia grave (Infante AJ. y Kraig E, Int Rev Immunol 1999;18 (1-2):83; Oshima M. *et al.*, Eur J Immunol diciembre de 1990;20 (12):2563), neuropatías, neuropatías motoras (Kornberg AJ. J Clin Neurosci. mayo de 2000; 7 (3): 191); síndrome de Guillain-Barre y neuropatías autoinmunitarias (Kusunoki S. Am J Med Sci. abril de 2000;319 (4):234), miastenia, síndrome miasténico de Lambert-Eaton (Takamori M. Am J Med Sci. abril de 2000;319 (4):204); enfermedades neurológicas paraneoplásicas, atrofia cerebelosa, atrofia cerebelosa paraneoplásica y síndrome de la persona rígida (Hiemstra HS. *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 27 de marzo de 2001;98(7):3988); síndrome de la persona rígida no paraneoplásico, atrofas cerebelosas progresivas, encefalitis, encefalitis de Rasmussen, esclerosis lateral amiotrófica, corea de Sydenham, síndrome de Gilles de la Tourette y poliendocrinopatías autoinmunitarias (Antoine JC. y Honnorat J. Rev Neurol (París) enero de 2000;156 (1):23); neuropatías disimunitarias (Nobile-Orazio E. *et al.*, Electroencephalogr Clin Neurophysiol Supl. 1999;50:419); neuromiotonía adquirida, artrogriposis múltiple congénita (Vincent A. *et al.*, Ann NY Acad Sci. 13 de mayo de 1998;841:482), neuritis, neuritis óptica (Soderstrom M. *et al.*, J Neurol Neurosurg Psychiatry mayo de 1994;57 (5):544) y enfermedades neurodegenerativas.

Los ejemplos de enfermedades musculares autoinmunitarias incluyen, pero sin limitación, miositis, miositis autoinmunitaria y síndrome de Sjögren primario (Feist E. *et al.*, Int Arch Allergy Immunol septiembre de 2000;123 (1):92) y enfermedad autoinmunitaria del músculo liso (Zauli D. *et al.*, Biomed Pharmacother junio de 1999;53 (5- 6): 234).

Los ejemplos de enfermedades nefríticas autoinmunitarias incluyen, pero sin limitación, nefritis y nefritis intersticial autoinmunitaria (Kelly CJ. J Am Soc Nephrol, agosto de 1990;1 (2):140).

Los ejemplos de enfermedades autoinmunitarias relacionadas con la reproducción incluyen, pero sin limitación, pérdidas fetales repetidas (Tincani A. *et al.*, Lupus 1998;7 Suppl 2:S107-9).

Los ejemplos de enfermedades del tejido conjuntivo autoinmunitarias incluyen, pero sin limitación, enfermedades del oído, enfermedades autoinmunitarias del oído (Yoo TJ. *et al.*, Cell Immunol Agosto de 1994;157 (1):249) y enfermedades autoinmunitarias del oído interno (Gloddek B. *et al.*, Ann N Y Acad Sci 29 de diciembre de 1997;830:266).

Los ejemplos de enfermedades sistémicas autoinmunitarias incluyen, pero sin limitación, lupus eritematoso sistémico (Erikson J. *et al.*, Immunol Res 1998;17 (1-2):49) y esclerosis sistémica (Renaudineau Y. *et al.*, Clin Diagn Lab Immunol. marzo de 1999;6 (2):156); Chan OT. *et al.*, Immunol Rev junio de 1999;169:107).

De acuerdo con un aspecto específico, la enfermedad autoinmunitaria se selecciona del grupo que consiste en una diabetes tipo 1, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, celiaquía y accidente cerebrovascular.

Tal como se ha mencionado, las células de la divulgación se pueden obtener de cualquier donante de células. Por tanto, el sujeto a tratar puede ser un sujeto humano mientras que las células pueden obtenerse de un donante singénico (p. ej., autólogo) o no singénico (p. ej., alogénico o xenogénico con respecto al receptor).

Como se usa en el presente documento, el término células "singénicas" se refiere a células que son esencialmente genéticamente idénticas al sujeto o esencialmente a todos los linfocitos del sujeto. Los ejemplos de células singénicas incluyen células derivadas del sujeto (también denominadas en la técnica como "autólogas"), de un clon del sujeto, o de un gemelo idéntico del sujeto.

Como se usa en el presente documento, el término células "no singénicas" se refiere a células que no son esencialmente genéticamente idénticas al sujeto o esencialmente a todos los linfocitos del sujeto, tales como células alogénicas o células xenogénicas.

Como se usa en el presente documento, el término "alogénico" se refiere a células que derivan de un donante que es de la misma especie que el sujeto, pero que es sustancialmente no clonal con el sujeto. Normalmente, los mamíferos gemelos no cigóticos exogámicos de la misma especie son alogénicos entre sí. Se apreciará que una célula alogénica puede ser HLA idéntica, parcialmente HLA idéntica o HLA no idéntica (es decir, que muestra uno o más determinantes HLA dispares) con respecto al sujeto.

Como se usa en el presente documento, el término "xenogénico" se refiere a una célula que expresa sustancialmente antígenos de una especie diferente con respecto a la especie de una proporción sustancial de los linfocitos del sujeto. Normalmente, los mamíferos exogámicos de diferentes especies son xenogénicos entre sí.

La presente divulgación prevé que las células xenogénicas procedan de una diversidad de especies. Por tanto, de acuerdo con un aspecto, las células pueden proceder de cualquier mamífero. Los orígenes de especies adecuados para las células comprenden los principales animales domésticos o ganado y primates. Tales animales incluyen, pero sin limitación, porcinos (por ejemplo, cerdo), bovinos (por ejemplo, vaca), equinos (por ejemplo, caballo), ovinos (por ejemplo, cabra, oveja), felinos (por ejemplo, *Felis domestica*), caninos (por ejemplo, *Canis domestica*), roedores (por

ejemplo, ratón, rata, conejo, cobaya, jerbo, hámster) o primates (por ejemplo, chimpancé, macaco de la India, mono macaco, tití).

- 5 Las células de origen xenogénico (por ejemplo, origen porcino) se obtienen preferentemente de una fuente que se sabe que está libre de zoonosis, tales como los retrovirus endógenos porcinos. De manera similar, las células o tejidos derivados de humanos se obtienen preferentemente de fuentes sustancialmente libres de patógenos.

De acuerdo con un aspecto, las células no son singénicas con el sujeto.

- 10 De acuerdo con un aspecto, las células son alogénicas con el sujeto.

De acuerdo con un aspecto, las células son singénicas con el sujeto (por ejemplo, autólogas).

- 15 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, el sujeto es un ser humano y las células son de origen humano (por ejemplo, no autólogas).

De acuerdo con un aspecto, el sujeto es un ser humano y las células son de origen xenogénico (por ejemplo, origen porcino).

- 20 Puede emplearse cualquier método conocido en la técnica para obtener células para trasplante. Por tanto, por ejemplo, las células inmunitarias (por ejemplo, linfocitos T, linfocitos B, linfocitos NK, DC) se pueden obtener recogiendo sangre periférica de un donante. Los métodos para recoger sangre periférica son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero sin limitación, extracción de hasta 500-1000 ml de sangre total de un donante y recolectada en un recipiente que contenga un anticoagulante (por ejemplo, heparina o citrato) o por aféresis, un procedimiento en el que la sangre
- 25 periférica de un individuo se pasa a través de un aparato, produciendo un constituyente predominante (por ejemplo, células mononucleares como linfocitos, monocitos o células dendríticas), y devolver los otros constituyentes a la circulación del sujeto. De forma alternativa, las células se pueden obtener por cultivo de células *in vitro* o *ex-vivo*. Se apreciará que las células de la divulgación pueden ser preparaciones frescas o congeladas (p. ej., crioconservadas).

- 30 Dependiendo del contexto del trasplante, para facilitar el injerto de las células, el método puede comprender además ventajosamente acondicionar al sujeto en condiciones subletales, condiciones letales o supraletales previas al trasplante.

- 35 Como se usa en el presente documento, los términos "subletal", "letal" y "supraletal", cuando están relacionados con el acondicionamiento de sujetos de la presente invención, se refieren a tratamientos mielotóxicos y/o linfocitotóxicos que, cuando se aplican a una población representativa de los sujetos, respectivamente, son normalmente: no letales para prácticamente todos los miembros de la población; letales para algunos pero no para todos los miembros de la población; o letales para prácticamente todos los miembros de la población en condiciones normales de esterilidad.

- 40 De acuerdo con algunos aspectos de la invención, el acondicionamiento subletal, letal o supraletal comprende la irradiación corporal total (TBI), irradiación linfoide total (TLI, es decir, exposición de todos los ganglios linfáticos, el timo y el bazo), irradiación corporal parcial (por ejemplo, exposición específica del colon, mama, etc.), acondicionamiento mieloablativo y/o acondicionamiento no mieloablativo, p.ej., con diferentes combinaciones incluyendo, aunque no de forma limitativa, bloqueo coestimulador, agente quimioterapéutico y/o inmunoterapia con anticuerpos. De acuerdo con
- 45 algunos aspectos de la invención, el acondicionamiento comprende una combinación de cualquiera de los protocolos de acondicionamiento descritos anteriormente (por ejemplo, agente quimioterapéutico y TBI, bloqueo coestimulador y agente quimioterapéutico, inmunoterapia con anticuerpos y agente quimioterapéutico, etc.).

- 50 De acuerdo con un aspecto, la TBI comprende una dosis de irradiación única o fraccionada dentro del intervalo de 0,5-1 Gy, 0,5-1,5 Gy, 0,5-2,5 Gy, 0,5-5 Gy, 0,5-7,5 Gy, 0,5-10 Gy, 0,5-15 Gy, 1-1,5 Gy, 1-2 Gy, 1-2,5 Gy, 1-3 Gy, 1-3,5 Gy, 1-4 Gy, 1-4,5 Gy, 1-1,5 Gy, 1-7,5 Gy, 1-10 Gy, 2-3 Gy, 2-4 Gy, 2-5 Gy, 2-6 Gy, 2-7 Gy, 2-8 Gy, 2-9 Gy, 2-10 Gy, 3-4 Gy, 3-5 Gy, 3-6 Gy, 3-7 Gy, 3-8 Gy, 3-9 Gy, 3-10 Gy, 4-5 Gy, 4-6 Gy, 4-7 Gy, 4-8 Gy, 4-9 Gy, 4-10 Gy, 5-6 Gy, 5-7 Gy, 5-8 Gy, 5-9 Gy, 5-10 Gy, 6-7 Gy, 6-8 Gy, 6-9 Gy, 6-10 Gy, 7-8 Gy, 7-9 Gy, 7-10 Gy, 8-9 Gy, 8-10 Gy, 10-12 Gy o 10-15 Gy.

- 55 De acuerdo con un aspecto específico, la TBI comprende una dosis de irradiación única o fraccionada dentro del intervalo de 1-7,5 Gy.

- 60 De acuerdo con un aspecto, la etapa de acondicionamiento se efectúa acondicionando al sujeto en condiciones supraletales, como en condiciones mieloablativas.

De forma alternativa, la etapa de acondicionamiento puede efectuarse acondicionando al sujeto en condiciones letales o subletales, tal como acondicionando al sujeto en condiciones mielorreductoras o condiciones no mieloablativas.

- 65 De acuerdo con un aspecto, la etapa de acondicionamiento se efectúa acondicionando al sujeto con un fármaco mieloablativo (p. ej., busulfán o melfalán) o un fármaco no mieloablativo (p. ej., ciclofosfamida o fludarabina).

Los ejemplos de agentes acondicionadores que se pueden usar para acondicionar al sujeto incluyen, sin limitación, irradiación, agentes farmacológicos y células inductoras de tolerancia (como se describe en el presente documento).

- 5 Ejemplos de agentes farmacológicos incluyen fármacos mielotóxicos, fármacos linfocitotóxicos y fármacos inmunosupresores (descritos en detalle a continuación).

Los ejemplos de fármacos mielotóxicos incluyen, sin limitación, busulfán, dimetil mileran, melfalán y tiotepa.

- 10 Adicionalmente, o como alternativa, el método puede comprender además acondicionar al sujeto con un régimen inmunosupresor antes de, concomitantemente con, o después del trasplante de las células.

Los ejemplos de tipos adecuados de regímenes inmunosupresores incluyen la administración de fármacos inmunosupresores y/o irradiación inmunosupresora.

- 15 En la bibliografía de la técnica se proporciona una amplia orientación para seleccionar y administrar regímenes inmunosupresores adecuados para el trasplante (por ejemplo, consúltase: Kirkpatrick CH. y Rowlands DT Jr., 1992. JAMA. 268, 2952; Higgins RM. et al., 1996. Lancet 348, 1208; Suthanthiran M. y Strom TB., 1996. New Engl. J. Med. 331, 365; Midthun DE. et al., 1997. Mayo Clin Proc. 72, 175; Morrison VA. et al., 1994. Am J Med. 97, 14; Hanto DW., 1995. Annu Rev Med. 46, 381; Senderowicz AM. et al., 1997. Ann Intern Med. 126, 882; Vincenti F. et al., 1998. New Engl. J. Med. 338, 161; Dantal J. et al. 1998. Lancet 351, 623).
- 20

- 25 Los ejemplos de agentes inmunosupresores incluyen, pero sin limitación, tacrolimus (también conocido como FK-506 o fujimicina, nombres comerciales: Prograf, Advagraf, Protopic), micofenolato de mofetilo, micofenolato de sodio, prednisona, metotrexato, ciclofosfamida, ciclosporina, ciclosporina A, cloroquina, hidroxiclороquina, sulfasalazina (sulfasalazopirina), sales de oro, D-penicilamina, leflunomida, azatioprina, anakinra, infliximab (REMICADE), etanercept, bloqueadores de TNF alfa, un agente biológico que se dirige a una citocina inflamatoria y un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE). Los ejemplos de AINE incluyen, pero sin limitación, ácido acetilsalicílico, salicilato de magnesio y colina, diflunisal, salicilato de magnesio, salsalato, salicilato de sodio, diclofenaco, etodolaco, fenoprofeno, flurbiprofeno, indometacina, cetoprofeno, ceterolaco, meclofenamato, naproxeno, nabumetona, fenilbutazona, piroxicam, sulindaco, tolmetina, paracetamol, ibuprofeno, inhibidores de Cox-2, tramadol, rapamicina (sirolimus) y análogos de rapamicina (como CCI-779, RAD001, AP23573). Estos agentes pueden administrarse individualmente o en combinación.
- 30

- 35 Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se refiere a  $\pm 10\%$ .

Las expresiones "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "que tiene" y sus conjugaciones significan "que incluye pero sin limitación".

- 40 La expresión "que consiste en" significa "que incluye y se limita a".

La expresión "que consiste esencialmente en" significa que la composición, el método o la estructura puede incluir ingredientes, etapas y/o partes adicionales, pero solo si los ingredientes, las etapas y/o las partes adicionales no alteran materialmente las características básicas y novedosas de la composición, el método o la estructura reivindicados.

45

Como se usa en el presente documento, la forma en singular "un", "uno/a" y "el/la" incluyen referencias en plural, salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Por ejemplo, la expresión "un compuesto" o "al menos un compuesto" puede incluir una pluralidad de compuestos, incluyendo mezclas de los mismos.

50

- A lo largo de la presente solicitud, diversos aspectos de esta divulgación pueden presentarse en un formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalo es únicamente por conveniencia y brevedad y no debería interpretarse como una limitación inflexible sobre el alcance de la invención. Por consiguiente, debería considerarse que la descripción de un intervalo ha divulgado específicamente todos los posibles subintervalos así como valores numéricos individuales en ese intervalo. Por ejemplo, debe considerarse que la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 ha divulgado específicamente subintervalos tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto es aplicable independientemente de la amplitud del intervalo.
- 55

- 60 Siempre que se indique un intervalo numérico en el presente documento, se pretende incluir cualquier número citado (fraccionario o entero) dentro del intervalo indicado. Las expresiones "que varía/varía entre" un primer número indicador y un segundo número indicador y "que varía/varía de" un primer número indicador "a" un segundo número indicador se usan indistintamente en el presente documento y se entiende que incluyen los números indicadores primero y segundo, y todos los números fraccionarios y enteros entre ellos.
- 65

Como se utiliza en el presente documento, el término "método" se refiere a formas, medios, técnicas y procedimientos

para llevar a cabo una tarea dada incluyendo, aunque no de forma limitativa, aquellas formas, medios, técnicas y procedimientos tanto conocidos como desarrollados a partir de formas, medios, técnicas y procedimientos conocidos por los especialistas de las técnicas química, farmacológica, biológica, bioquímica y médica.

Se aprecia que determinadas características de la invención, que están, por claridad, descritas en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en un único aspecto. Por el contrario, diversas características de la invención, que están, por brevedad, descritas en el contexto de un único aspecto, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada o según sea adecuado en cualquier otro aspecto descrito de la invención. Determinadas características descritas en el contexto de diversos aspectos no han de considerarse características esenciales de esos aspectos, a menos que el aspecto no funcione sin esos elementos.

Diversos aspectos y aspectos de la presente divulgación como se han delineado anteriormente en el presente documento y como se reivindica en la sección de reivindicaciones a continuación encuentran soporte experimental en los siguientes ejemplos.

### Ejemplos

A continuación, se hace referencia a los siguientes ejemplos, que, junto con las descripciones anteriores, ilustran la divulgación de manera no limitante.

Generalmente, la nomenclatura utilizada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente divulgación incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican exhaustivamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook *et al.*, (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson *et al.*, "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren *et al.* (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vol. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías expuestas en las patentes de los Estados Unidos números 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites *et al.* (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª edición), Appleton y Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); se describen ampliamente inmunoensayos disponibles en la bibliografía científica y de patentes, véase, por ejemplo, las patentes de los EE.UU. números 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D. y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D. y Higgins S. J., Eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak *et al.*, "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). Se proporcionan otras referencias generales a lo largo del presente documento. Se cree que los procedimientos de los mismos son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para la comodidad del lector.

### MATERIALES GENERALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

#### Animales

Los ratones BALB/c, CB6 (F1) y C57BL/6 hembra de 6 a 12 semanas se obtuvieron en Harlan Laboratories o crecieron en las instalaciones para animales del Weizmann Institute of Science. Todos los ratones se mantuvieron en jaulas pequeñas (5 animales en cada jaula) y se les alimentó con alimentos estériles y agua ácida. Todos los estudios fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales del Instituto Weizmann de Ciencias.

#### Preparación de Tmc anti-terceros de ratón no reactivos en el hospedador

Se prepararon Tmc anti-terceros como se ha descrito previamente [Ophir E *et al.*, Blood (2010) 115: 2095-2104] brevemente, los esplenocitos de los ratones donantes se cultivaron frente a esplenocitos de terceros irradiados durante 60 horas con privación de citocinas. Posteriormente, las células CD8<sup>+</sup> se seleccionaron positivamente utilizando partículas magnéticas (BD Pharmingen) y se cultivaron en un entorno libre de Ag. rhIL-15 (20 ng/ml; R&D Systems) se agregó cada dos días. Para lograr una población purificada al final del cultivo (día 16), los linfocitos Tmc se seleccionaron positivamente para la expresión de CD62L mediante clasificación de células activadas magnéticamente [MACS, Miltenyi, Bergisch Gladbach, Alemania].

#### Trasplante de médula ósea

1. Se recogieron los huesos largos de ratones Balb/c o C57BL/6 [desnudos o de tipo silvestre (WT)]. La médula

ósea se extrajo lavando o triturando los huesos para obtener una suspensión de células individuales. Algunas preparaciones recogidas de ratones WT se sometieron a agotamiento de linfocitos T mediante clasificación de células activadas magnéticamente. Se contó la médula ósea y se llevó a la concentración correcta y luego se inyectó a ratones i.v. a la vena de la cola o intraorbitariamente.

2. Antes del trasplante, los ratones se sometieron a un régimen de acondicionamiento. El acondicionamiento de intensidad reducida (RIC) comprendía someter a los ratones a dosis de irradiación subletales (es decir, dosis de irradiación de la que los ratones receptores podían recuperarse espontáneamente) o someter a los ratones a dosis bajas de fármacos mieloablativo (p. ej., busulfán) o no mieloablativo (p. ej., ciclofosfamida). La irradiación corporal total (TBI) se administró usando una máquina de rayos gamma o rayos X (por ejemplo, XRAD-320). Los fármacos se administraron por vía i.v., s.c., i.p. o por vía oral.

#### *Trasplante de células OT1+*

Se recogieron ganglios linfáticos y/o bazo de ratones transgénicos OT-1. Los ratones eran ratones OT-1 portadores del gen CD45.1 y/o con la constitución de una mutación RAG-/- . De forma alternativa, los ratones OT-1 eran ratones F1-OT1, progenie de ratones hostXOT-1, útil para la eliminación de fenómenos allogénicos. Se crearon suspensiones de células individuales y luego se sometieron a purificación de linfocitos T mediante clasificación de células activadas magnéticamente [MACS, Miltenyi, Bergisch Gladbach, Alemania]. La pureza de la población de linfocitos T OT-1 resultante se analizó mediante FACS. A continuación, las células se inyectaron como células "frescas" o se cultivaron de otro modo *ex-vivo* para producir linfocitos Tmc como se ha descrito anteriormente, es decir, por activación de terceros hacia esplenocitos irradiados de un ratón que expresa ovoalbúmina. A continuación se inyectaron linfocitos Tmc OT-1 como se describe en el presente documento.

#### *Análisis de citometría de flujo*

El análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) se realizó usando un Becton Dickinson FAC-Scan modificado. Las células se tiñeron con anticuerpos marcados específicos para Vα2, Vβ5, H2Dd, H2Kb, CD45.1, CD45.2, CD8a, CD4, CD25, CD69, CD19 (Biolegend; BD; Miltenyi).

#### *Ensayo de actividad CTL (ensayo de Cr<sup>51</sup>)*

Se sacrificó a los ratones, se recogieron bazo y GL y se seleccionaron células CD8<sup>+</sup> (y seleccionado negativamente para H-2D<sup>d</sup> para excluir "Tmc"). Estos HTC vírgenes fueron probados para determinar su capacidad de eliminar las dianas C3H (H-2<sup>k</sup>) o BALB/c (H-2<sup>d</sup>) en un ensayo de liberación de cromo. Los esplenocitos BALB/c y C3H, utilizados como células diana, fueron pretratados con 2 µg/ml de concanavalina A (Sigma, St. Louis, MO) durante 48 horas y se expusieron a 70 µCi de <sup>51</sup>Cr (Perkin Elmer, Wellesley, MA) durante 1 hora. Las células efectoras se prepararon a partir de células CD8<sup>+</sup> seleccionadas de ratones C57BL/6 y se incubaron durante 6 días en diferentes diluciones frente a esplenocitos BALB/c o C3H en 12 réplicas para cada dilución en una placa de 96 pocillos con IL-2 (20 U/ml). El día 6, números titulados de células efectoras y 5 x 10<sup>3</sup> dianas marcadas con <sup>51</sup>Cr se mezclaron en placas con fondo en forma de V en varias proporciones de efector/diana (E:D). La actividad citotóxica se midió en un ensayo de liberación de Cr<sup>51</sup> de 4 h. El porcentaje de lisis específica se calculó como (liberación experimental - liberación espontánea)/(liberación máxima - liberación espontánea) x 100. La liberación de <sup>51</sup>Cr por las células diana cultivadas en medio solo, o lisadas con SDS al 1 %, se definió como liberación espontánea o liberación total, respectivamente.

#### *Células mononucleares de sangre periférica (PBMC)*

Se aislaron PBMC de sangre total de pacientes y de voluntarios sanos mediante centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll. Cuando se indicó, las células se tipificaron para HLA de clase I mediante métodos serológicos como se ha descrito previamente [Manual of Tissue Typing Techniques. Washington DC, Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas, NIH DHEW Publicación 76-545, 1976, pág. 22].

#### *Generación de células dendríticas*

Los monocitos se aislaron mediante adherencia plástica y se cultivaron en placas de 6 pocillos utilizando 3 ml de medio Cellgro DC suplementado con suero humano al 1 % y penicilina/estreptomicina más GM-CSF (800 UI/ml) e IL-4 (20 ng/ml) (Peprotech, Hamburgo, Alemania). Después de 48 horas de cultivo, se añadieron 1,5 ml de medio (GM-CSF a 1600 UI/ml e IL4 a 20 ng/ml). 24 h más tarde, se recogieron las células no adherentes y se contaron las células grandes (principalmente DC inmaduras), resuspendidas en medio fresco que contiene GM-CSF 800 UI/ml, IL-4 20 ng/ml, LPS de E. coli O55:B5 a 10 ng/ml (Sigma, Deisenhofen, Alemania) e IFNγ (Peprotech, 100 UI/ml), y se sembraron a aproximadamente 10<sup>6</sup> DC por pocillo en 2 ml y se incubaron durante la noche. Al día siguiente, las células no adherentes se descartaron y las DC adherentes se eliminaron suavemente con PBS frío/HS al 1 % después de incubar en hielo durante 20 minutos. Se contaron las células grandes que consistían en DC maduras. Las células se irradiaron con 30 Gy para evitar el crecimiento de pocos linfocitos NK o T de memoria potencialmente contaminantes y luego se usaron para la estimulación de linfocitos T.

#### *Aislamiento de linfocitos T CD8 vírgenes de PBMC*

Los linfocitos T CD8 vírgenes se aislaron mediante selección negativa inicial utilizando un kit de selección negativa CD8 (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación, se agotaron los linfocitos T CD8<sup>+</sup> experimentadas con antígeno utilizando perlas de CD45RO y en una columna LD.

#### *Generación de linfocitos T CD8 humanos de memoria central anti-terceros*

Se aislaron linfocitos T CD8 vírgenes y se resuspendieron en medio de linfocitos T complementado con IL-21 (Peprotech, 30 ng/ml). Se añadieron DC irradiadas en una proporción de 1:4 DC:linfocitos T con  $4 \times 10^5$  linfocitos T por pocillo de una placa de 48 pocillos. El volumen total de cada pocillo fue de 500  $\mu$ l.

72 h después de iniciado el cultivo, se añadieron 500  $\mu$ l de medio de linfocitos T con IL-7 e IL-15 (Peprotech, concentraciones finales de 5 ng/ml) y las células se alimentaron posteriormente cada 2-3 días como se describe en la sección de resultados.

#### *Análisis estadístico*

El análisis de los datos de supervivencia se realizó mediante curvas de Kaplan-Meier (prueba de rangos logarítmicos). La comparación de medias se realizó mediante la prueba t de Student.

#### **EJEMPLO 1**

##### *Los linfocitos Tmc MHC no compatibles sobreviven en ratones hospedadores en un contexto de médula ósea singénica y ejercen actividad de veto específica*

Teniendo en cuenta que el trasplante singénico de médula ósea (BMT), incluso cuando se administra en el contexto de la irradiación corporal total (TBI) letal es mucho más seguro en humanos en comparación con el BMT alogénico, los presentes inventores buscaron en primer lugar determinar si las células F1-Tmc transferidas adoptivamente sobreviven al ataque de HTC anti-donante del hospedador cuando se infunden junto con TDBMT singénico (figuras 1A-B). Tal como puede observarse en las figuras 2A-B, F1-Tmc persistió en la sangre periférica el día 60 después del trasplante. Los linfocitos Tmc comprendían aproximadamente  $13 \% \pm 10$  del compartimento total de CD8<sup>+</sup> (datos no mostrados). A continuación, para evaluar la capacidad de los linfocitos Tmc para inducir la eliminación de clones específicos de antígeno dentro de la población de HTC policlonal de tipo silvestre y para verificar que los HTC restantes conservan su funcionalidad, se empleó un ensayo de eliminación de liberación de cromo. Los resultados muestran que los HTC H2<sup>b</sup>CD8 de ratones tratados con Tmc mostraban una eliminación significativamente menor de dianas H-2<sup>d</sup> y retenían la capacidad de eliminar las dianas H-2<sup>k</sup>, mientras que los ratones no tratados con Tmc (es decir, el grupo de MO solo) mostraron niveles similares de eliminación para ambos tipos de células (figura 3). Estos resultados indican que Tmc ejerce una actividad de veto específica sobre una población de HTC policlonal y confirma que los clones no eliminados por Tmc, conservan su funcionalidad. Posteriormente, estos experimentos se repitieron en ratones acondicionados con condicionamiento de intensidad reducida (RIC), más adecuado para la aplicación clínica. Por lo tanto, los estudios en ratones Balb/c irradiados subletalmente con 5,5 Gy TBI, inyectados con médula ósea empobrecida en linfocitos T singénicos (TDBMT) y Tmc alogénicos (Balb x Black) F1 (ilustrado en la figura 1C), arrojaron resultados similares (figura 4). Los linfocitos Tmc estuvieron presentes en la sangre periférica de estos ratones durante más de 15 meses (cuando finalizó el experimento, no se muestran los datos). Por tanto, la supervivencia de Tmc MHC incompatibles se induce mediante un procedimiento muy seguro que implica el acondicionamiento con TBI subletal de 5,5 Gy y BMT autólogo.

#### **EJEMPLO 2**

##### *Los linfocitos Tmc MHC no compatibles sobreviven en ratones hospedadores en ausencia de un trasplante de médula ósea*

A la luz de los datos anteriores, se evaluó la capacidad de los linfocitos Tmc solos para inducir tolerancia en ausencia de MO. El alcance de tal protocolo sería mucho mayor. Específicamente, la inducción de inmunotolerancia mediante la administración de linfocitos Tmc anti-terceros solo, en condiciones seguras, sería una ventaja no solo para las personas inmunocomprometidas, sino que posiblemente podría permitir el tratamiento de enfermedades hematológicas no malignas (por ejemplo, anemia y talasemia), enfermedades autoinmunitarias y podría proporcionar una plataforma para la administración de terapia celular. Inicialmente, los presentes inventores intentaron definir la dosis mínima de irradiación con la cual los linfocitos Tmc de origen F1 injertan, con el fin de establecer el modelo en el que se puede probar la inducción de tolerancia en los hospedadores. Para este fin, se expuso a ratones Balb/c a una variedad de dosis de acondicionamiento subletales con y sin transferencia adoptiva de linfocitos F1-Tmc de CB6. El análisis de sangre periférica total para linfocitos Tmc H2<sup>db</sup> positivo mostró que la dosis de irradiación mínima con la que se podía detectar Tmc (es decir, cuando no se rechazaban los linfocitos Tmc) era de 5,5 Gy TBI (Figura 5). En consecuencia, se probó la sostenibilidad de los Tmc derivados de C57BL/6 completamente alogénicos para sobrevivir con una dosis subletal de TBI de 5,5 Gy (como se muestra en la figura 1C). Este experimento pretendía verificar que las células de origen alogénico no inducen EICH y que la eliminación de linfocitos T anti-donante no está mediada por

alorreactividad sino por la actividad de veto. Además, una vez traducido a humanos y con el fin de producir tolerancia "disponible" que induzca linfocitos Tmc, lo más probable es que las células se deriven de fuentes alogénicas, no compatibles. Los resultados mostraron que los Tmc alogénicos derivados de C57BL/6 eran capaces de sobrevivir dentro de huéspedes Balb/c irradiados con 5,5 Gy (como se muestra en la figura 1C), mostrando porcentajes de Tmc ligeramente más bajos en la sangre periférica que los de los ratones que recibieron F1 Tmc de CB6 (figuras 6A- B). Este resultado puede atribuirse a un proceso de rechazo muy lento de los linfocitos Tmc. Aunque los linfocitos Tmc persisten en la sangre durante más de un año, la reducción en su número durante los primeros meses posteriores a la inyección, tomado junto con la eliminación de clones anti-hospedador detectados en el ensayo de liberación de cromo, sugiere fuertemente que los Tmc inducen tolerancia periférica.

Por lo tanto, la aplicación de Tmc solos se utiliza para crear una ventana de oportunidad, al menos durante unos meses, para la administración de tratamientos, como la terapia celular.

### EJEMPLO 3

*Los linfocitos Tmc MHC no compatibles admiten la transferencia adoptiva de células del mismo donante*

Para probar la hipótesis de que los linfocitos Tmc se pueden usar para la terapia celular adoptiva, los presentes inventores utilizaron ratones OT1 transgénicos que llevan un TCR contra el péptido de ovoalbúmina. La motivación para usar células transgénicas OT1 en este contexto provino de la idea de que estas células pueden usarse como modelo para terapias celulares conocidas como infusión de linfocitos de donante (DLI) con toda la población de linfocitos T de donante o con linfocitos T específicos de antígeno dirigidos contra antígenos virales o tumorales.

Inicialmente, se infundieron linfocitos T CD8+OT1+CD45.1 vírgenes en ratones con Tmc quiméricos, 90 días después de la transferencia adoptiva inicial de los Tmc. El objetivo principal era definir si la población de Tmc superviviente puede facilitar el injerto de células alogénicas recién infundidas. Antes de la inyección de linfocitos Tg vírgenes, la población de Tmc en ratones quiméricos se analizó mediante FACS. Por tanto, 2/5 y 9/11 ratones que habían recibido Tmc de C57BL/6 o Tmc de CB6, respectivamente, mantuvieron su población Tmc (figuras 6A-B).

Estos ratones fueron acondicionados adicionalmente en el día 90 después del trasplante con 2 Gy TBI (con el fin de agotar algunos linfocitos T para permitir la introducción de nuevos linfocitos T) y luego se les infundió a los ratones  $2 \times 10^6$  células OT1 (H-2<sup>b</sup>). Curiosamente, cuando se evaluaron el día 120 (30 días después del trasplante de células OT1), las células OT1 se pudieron detectar solo en aquellos ratones que habían mostrado una población de Tmc antes del trasplante (Figura 7). Estos resultados preliminares, que muestran que en ratones que presentan una población de Tmc se puede aceptar la adición de células del mismo origen del donante, se corroboraron adicionalmente utilizando células OT-1 transgénicas, de la siguiente manera: Las células CD8+OT-1 se trasplantaron junto con los Tmc el día 0, para evitar la necesidad de un acondicionamiento secundario (2 Gy TBI empleados previamente en el día 90), y se controló la presencia de células OT1 en la sangre periférica en diferentes momentos después de la infusión de células.

Como se muestra en la figura 8, los resultados de este experimento ilustran que:

1. Tmc de C57BL/6 así como Tmc (BalbxC57BL)F1 pueden persistir en receptores alogénicos.
2. Tmc de C57BL/6 puede conferir protección a las células CD8 OT-1 vírgenes cultivadas con la constitución C57BL/6 (OT-1+CD45.1+RAG-) cuando se co-inyecta, mientras que las células OT-1 por sí solas desaparecen de la circulación.
3. CB6(F1) Tmc que expresan el haplotipo MHC de los ratones C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) también pueden conferir protección a las células OT-1 vírgenes.

### EJEMPLO 4

*Las células de veto Tmc anti-terceros preparadas a partir de células de ratones OT-1 se injertan y sobreviven in vivo*

Los experimentos se llevaron a cabo en ratones acondicionados con acondicionamiento de intensidad reducida (RIC), adecuado para la aplicación clínica. Por lo tanto, los ratones Balb/c irradiados subletalmente con 5,5 Gy TBI, fueron inyectados con diferentes concentraciones de linfocitos Tmc no singénicos con origen de ratón OT-1 (ilustrado en la Figura 9). Los linfocitos Tmc estuvieron presentes en la sangre periférica de estos ratones al menos durante 30 días. Por tanto, la supervivencia de linfocitos Tmc MHC no compatible se induce mediante un procedimiento RIC seguro.

## REIVINDICACIONES

1. Una célula aislada que tiene un fenotipo de linfocito T de memoria central (Tmc), en donde dicho fenotipo Tmc comprende una firma CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD62L<sup>+</sup>/CD45RA<sup>-</sup>/CD45RO<sup>+</sup>, siendo dicha célula, una célula anti-terceros no inductora de reacción de injerto contra hospedador (EICH), que es inductora de tolerancia y capaz de anidar en los ganglios linfáticos después del trasplante, generándose dicha célula mediante un método que comprende:

(a) poner en contacto células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con un antígeno o antígenos de terceros en presencia de IL-21 para permitir el enriquecimiento de células reactivas al antígeno; y

(b) cultivar dichas células resultantes de la etapa (a) en presencia de IL-21, IL-15 e IL-7 para permitir la proliferación de células anti-terceros que comprenden dicho fenotipo de linfocito T de memoria central (Tmc),

transduciéndose dicha célula para expresar un receptor de la superficie celular que comprende un módulo de señalización del receptor de linfocitos T y un dominio extracelular dirigido contra un antígeno patológico.

2. Una célula aislada que tiene un fenotipo de linfocito T de memoria central (Tmc), en donde dicho fenotipo Tmc comprende una firma CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD62L<sup>+</sup>/CD45RA<sup>-</sup>/CD45RO<sup>+</sup>, siendo dicha célula, una célula anti-terceros no inductora de reacción de injerto contra hospedador (EICH), que es inductora de tolerancia y capaz de anidar en los ganglios linfáticos después del trasplante, generándose dicha célula mediante un método que comprende:

(a) poner en contacto células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con un antígeno o antígenos de terceros en presencia de IL-21 para permitir el enriquecimiento de células reactivas al antígeno; y

(b) cultivar dichas células resultantes de la etapa (a) en presencia de IL-21, IL-15 e IL-7 para permitir la proliferación de células anti-terceros que comprenden dicho fenotipo de linfocito T de memoria central (Tmc),

transduciéndose dicha célula para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) y un dominio extracelular dirigido contra un antígeno patológico.

3. Una célula aislada que tiene un fenotipo de linfocito T de memoria central (Tmc), en donde dicho fenotipo Tmc comprende una firma CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD62L<sup>+</sup>/CD45RA<sup>-</sup>/CD45RO<sup>+</sup>, siendo dicha célula, una célula anti-terceros no inductora de reacción de injerto contra hospedador (EICH), que es inductora de tolerancia y capaz de anidar en los ganglios linfáticos después del trasplante, generándose dicha célula mediante un método que comprende:

(a) poner en contacto células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con un antígeno o antígenos de terceros en presencia de IL-21 para permitir el enriquecimiento de células reactivas al antígeno; y

(b) cultivar dichas células resultantes de la etapa (a) en presencia de IL-21, IL-15 e IL-7 para permitir la proliferación de células anti-terceros que comprenden dicho fenotipo de linfocito T de memoria central (Tmc),

transduciéndose dicha célula para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde que dicho CAR comprende un dominio coestimulador o al menos dos dominios coestimuladores y un dominio extracelular dirigido contra un antígeno patológico.

4. Un método *in vitro* para generar la célula aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, comprendiendo el método transducir una célula que tiene un fenotipo de linfocito T de memoria central (Tmc), siendo dicha célula una célula inductora de tolerancia y capaz de anidar en los ganglios linfáticos después del trasplante, con un polinucleótido que codifica dicho receptor de la superficie celular que comprende un módulo de señalización del receptor de linfocitos T o un receptor de antígeno quimérico (CAR).

5. El método *in vitro* de la reivindicación 4, en donde la célula se transduce con un vector que comprende dicho polinucleótido.

6. El método *in vitro* de la reivindicación 4 o 5, en donde dicho polinucleótido codifica un receptor de linfocitos T transgénico (tg-TCR) o un receptor de antígeno quimérico (CAR).

7. La célula aislada de la reivindicación 1 o el método *in vitro* de la reivindicación 4, en donde dicho receptor de la superficie celular comprende un receptor de linfocitos T transgénico (tg-TCR) o un receptor de antígeno quimérico (CAR).

8. La célula aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 2-3 o 7, o el método *in vitro* de la reivindicación 4 o 7, en donde dicho CAR comprende:

un dominio de unión a antígeno que es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno; o

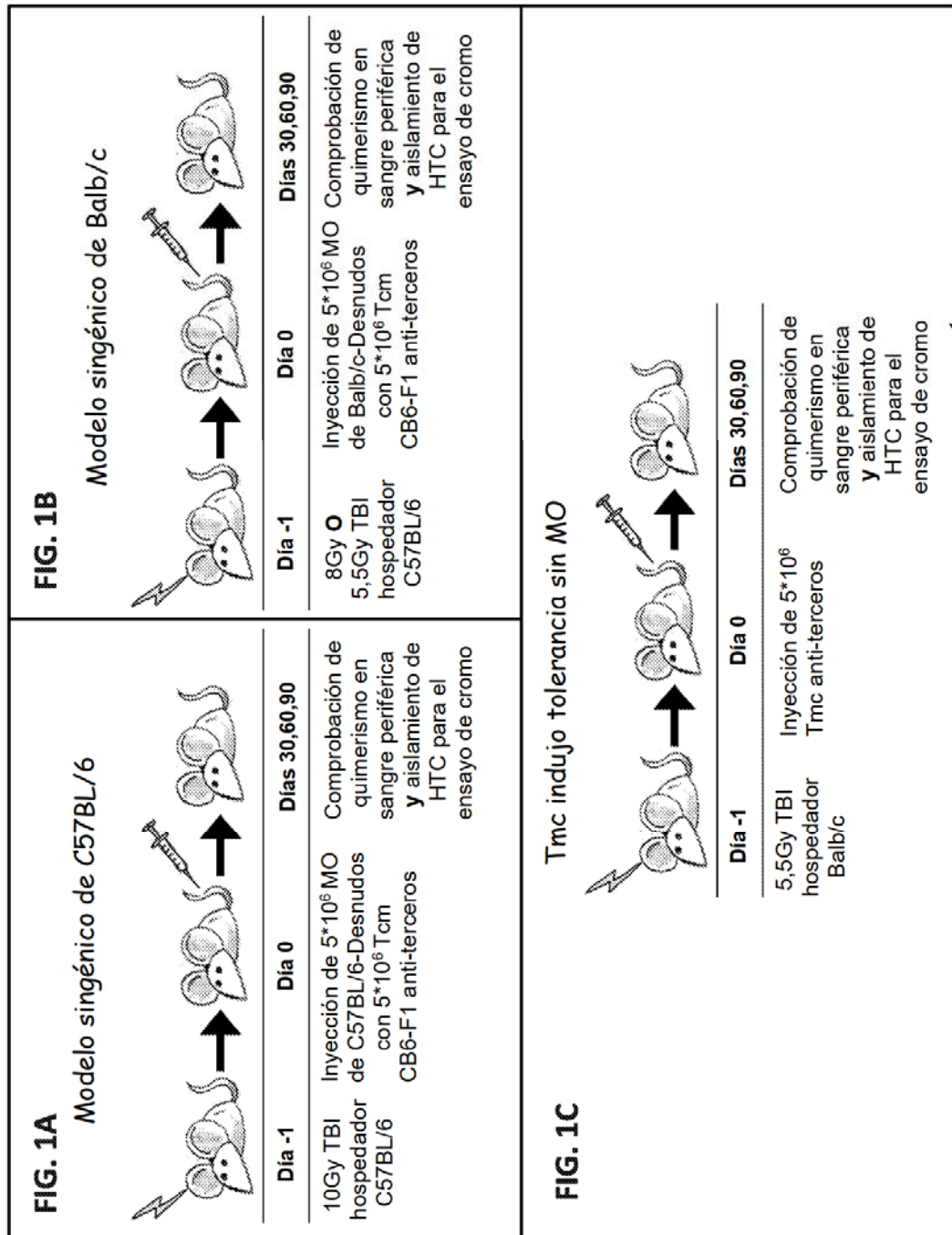
un CD3 ζ; o

al menos un dominio coestimulador seleccionado del grupo que consiste en CD28, CD134/OX40, CD137/4-1BB, Lck, ICOS y DAP10; o

al menos dos dominios coestimuladores seleccionados del grupo que consiste en CD28, CD134/OX40, CD137/4-

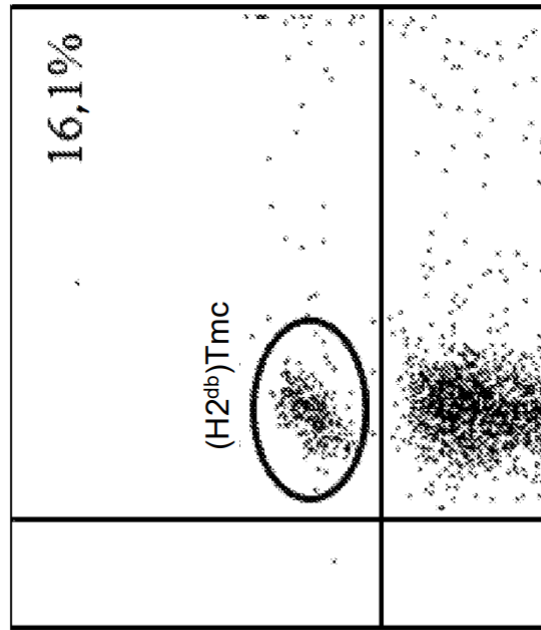
1BB, Lck, ICOS y DAP10.

- 5 9. La célula aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o 7-8, o el método *in vitro* de una cualquiera de las reivindicaciones 4-8, en donde dicha célula se modifica genéticamente adicionalmente para reprimir la expresión de al menos un gen de punto de control inmunitario endógeno en dicha célula.
- 10 10. La célula aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o 7-9, en donde dicho antígeno patológico se selecciona del grupo que consiste en un antígeno tumoral, un antígeno viral, un antígeno bacteriano, un antígeno fúngico, un antígeno protozoario y un antígeno de parásito.
- 15 11. La célula aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicho método comprende además el agotamiento de células CD4+ y/o CD56+ antes de la etapa (a).
12. La célula aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 u 11, en donde dicho método comprende además:  
15 (c) separar dichas células resultantes de la etapa (b) en suspensiones de células individuales.
- 20 13. La célula aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 u 11-12, en donde dicho método comprende además seleccionar las células activadas después de la etapa (a) y antes de la etapa (b), y opcionalmente en donde dicha selección de células activadas se efectúa mediante la selección de células CD137+ y/o CD25+.
- 25 14. La célula aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 u 11-13, en donde al menos el 50 % de las células aisladas son células CD3+CD8+ de las cuales al menos el 50 % tienen dicha firma.
15. Una población aislada de células que comprende la célula aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o 7-14.
16. Una composición farmacéutica que comprende la población de células de la reivindicación 15 y un vehículo farmacéuticamente activo.
- 30 17. Una cantidad terapéuticamente eficaz de la población de células de la reivindicación 15 para su uso en el tratamiento de una enfermedad maligna, una enfermedad viral o una enfermedad bacteriana en un sujeto que lo necesite.



**FIG. 2A**

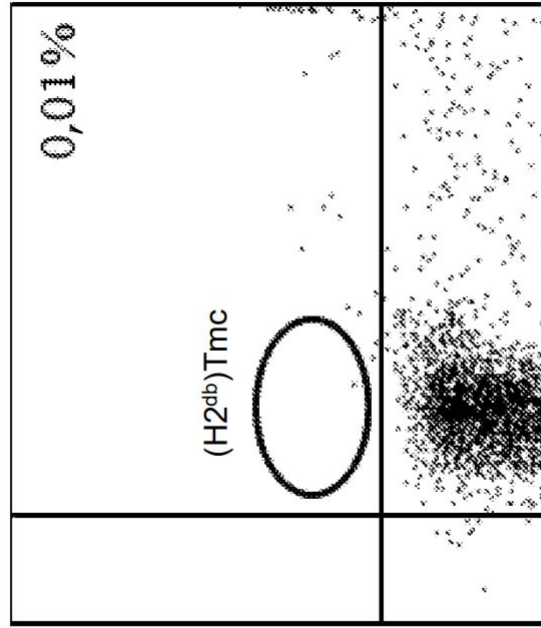
Ratones tratados con MO + F1-Tmc



H-2Dd

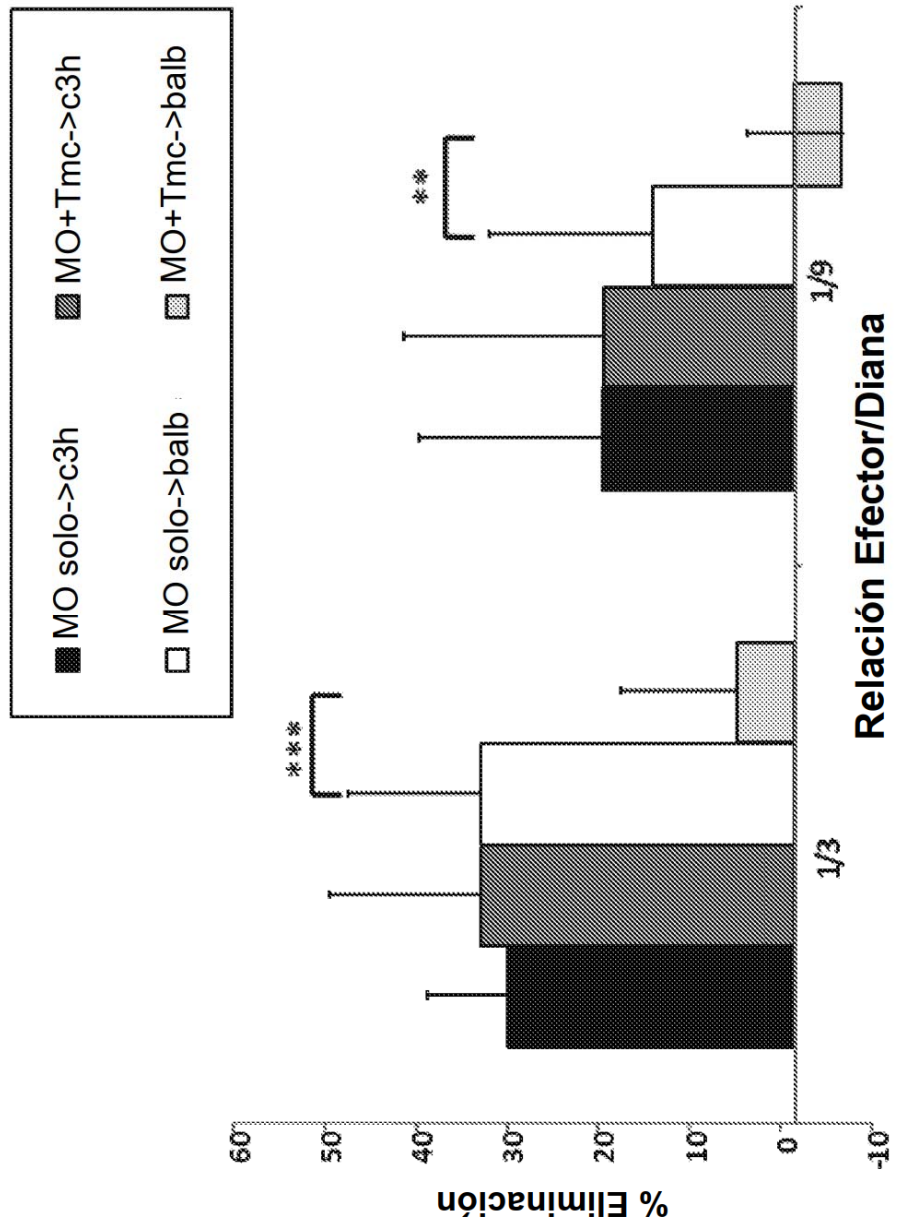
**FIG. 2B**

MO solo



H-2Kb

**FIG. 3**



**FIG. 4**

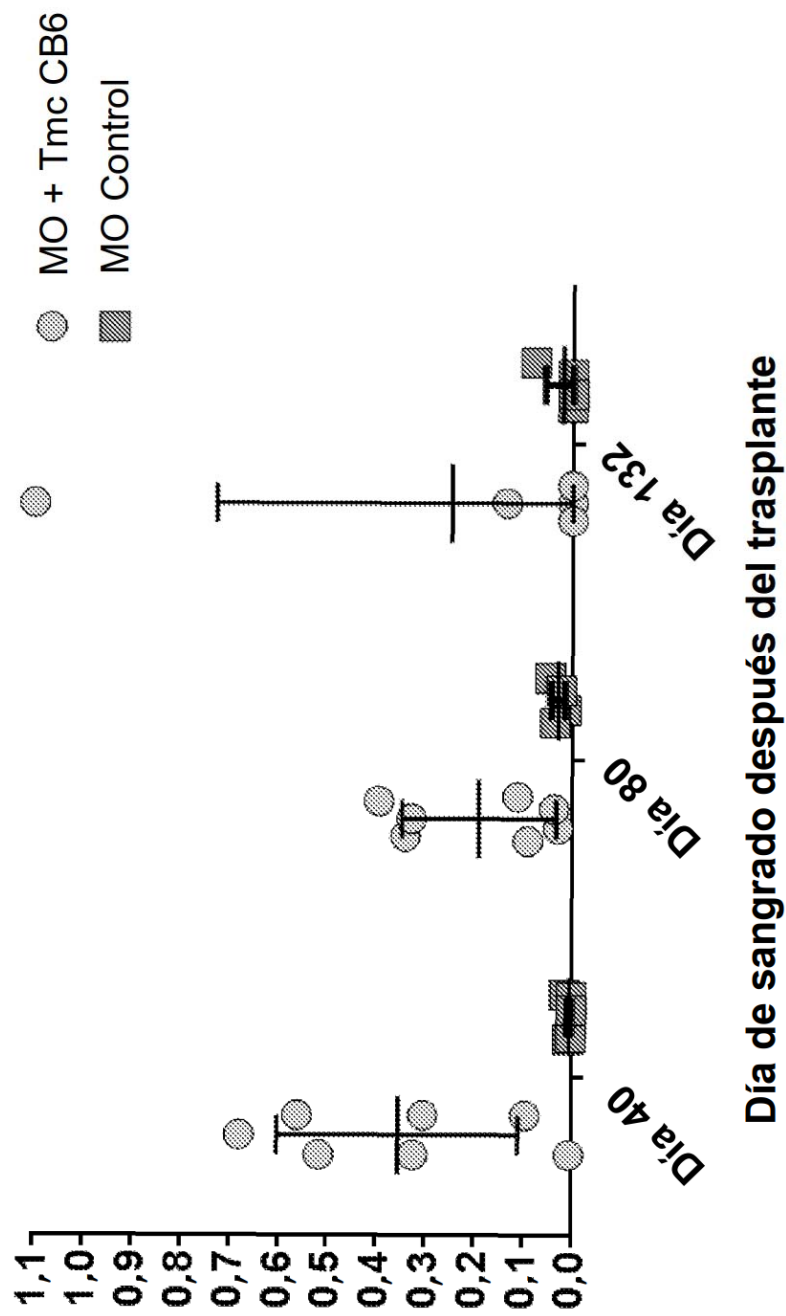


FIG. 5

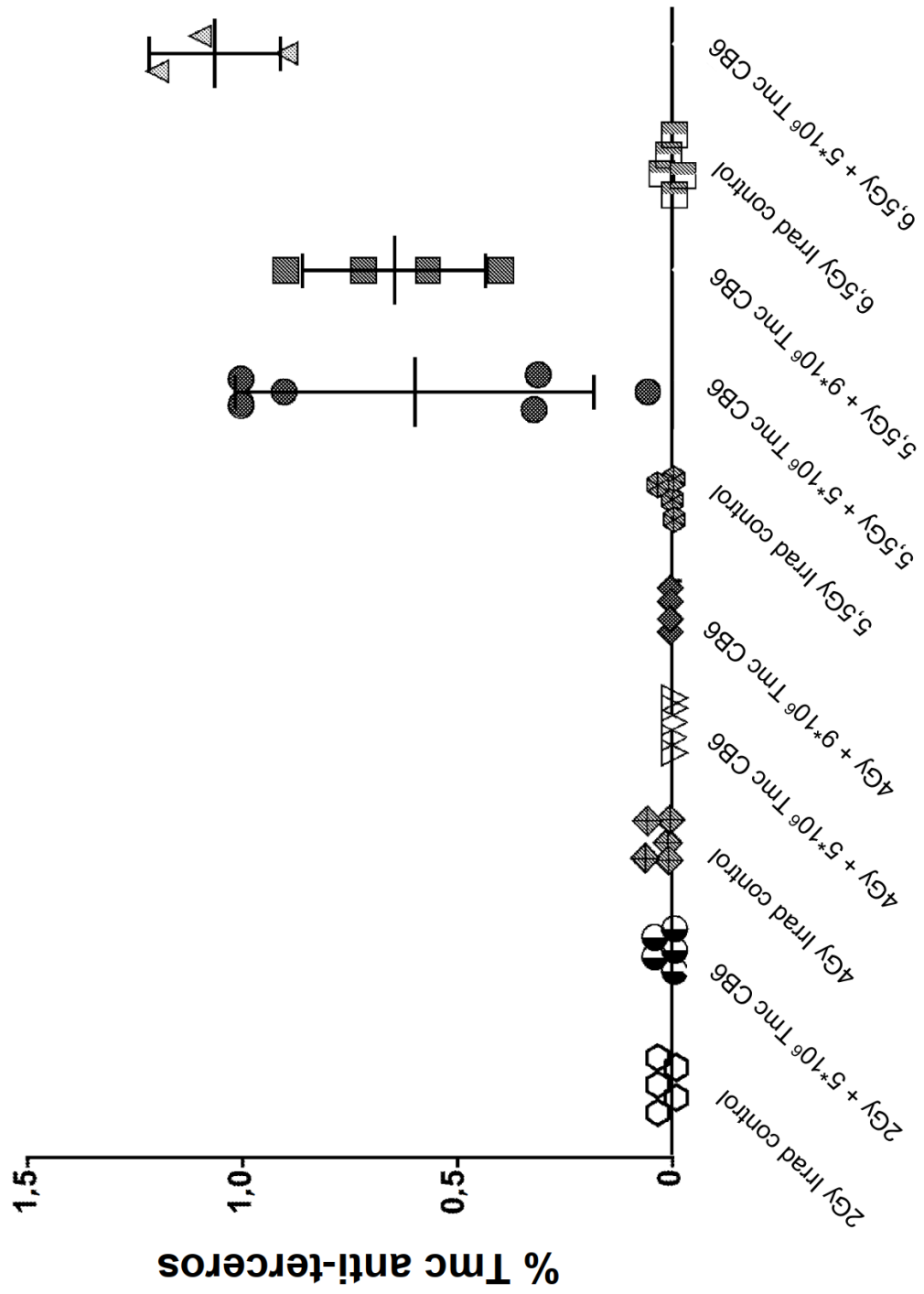


FIG. 6A

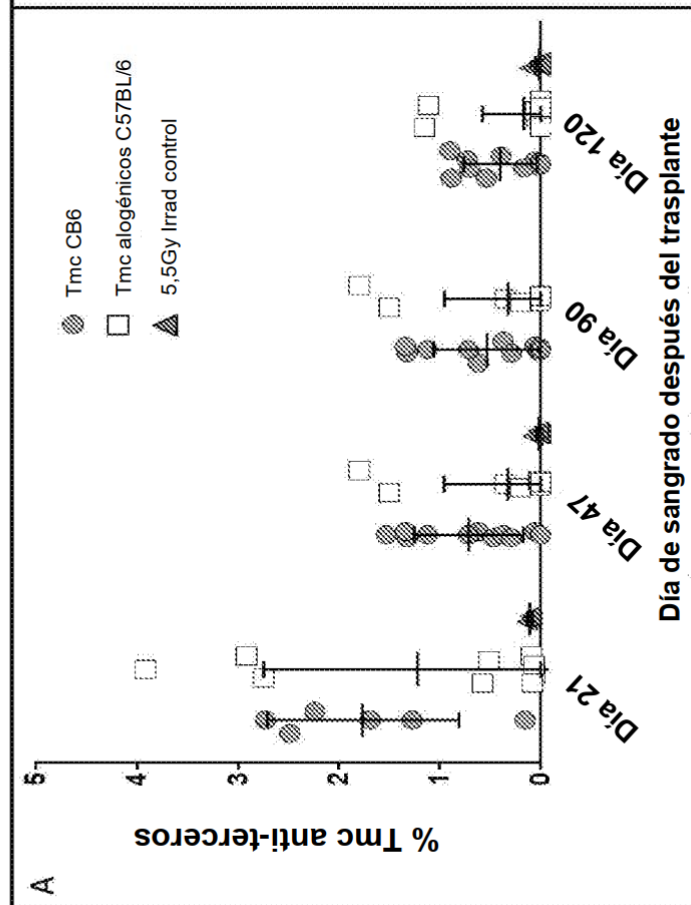


FIG. 6B

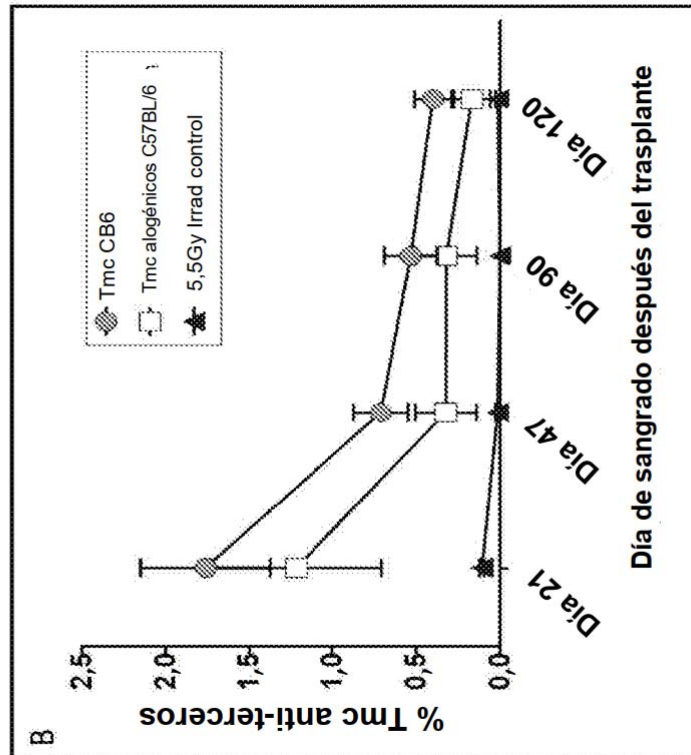
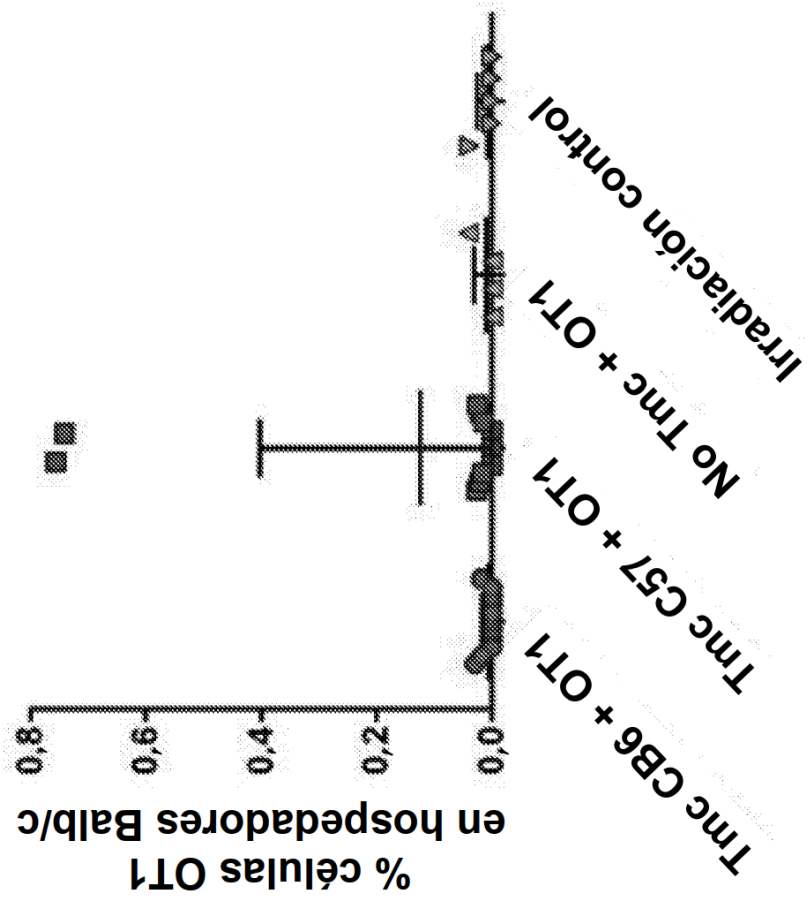


FIG. 7



**Fig. 8**

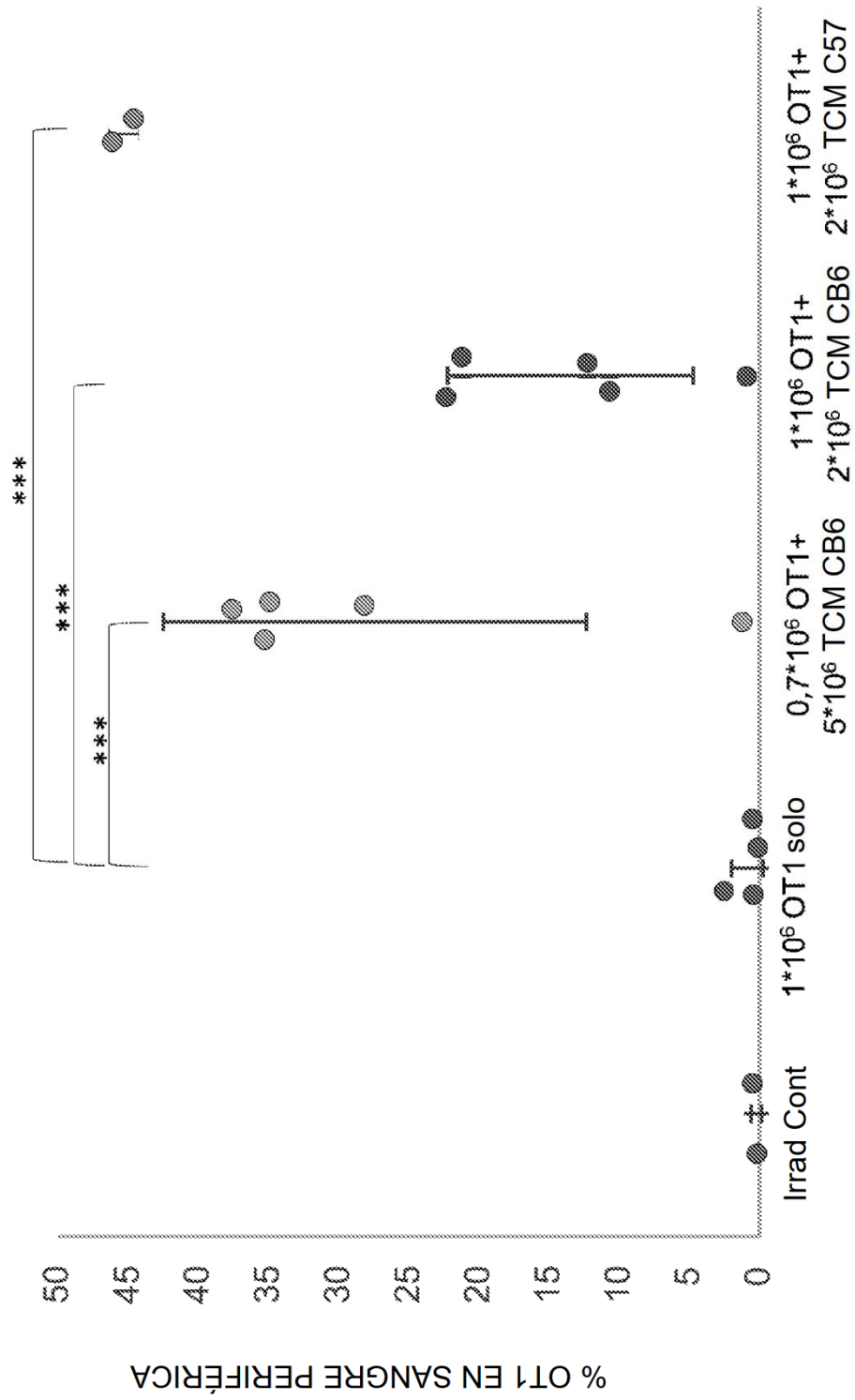


FIG. 9

