

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 959 953**

51 Int. Cl.:

A61K 35/17 (2015.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/44 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.08.2018** **PCT/US2018/046149**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.02.2019** **WO19032927**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.08.2018** **E 18760159 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.07.2023** **EP 3664820**

54 Título: **Métodos para producir composiciones celulares genéticamente modificadas y composiciones relacionadas**

30 Prioridad:

09.08.2017 US 201762543363 P

08.12.2017 US 201762596770 P

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

29.02.2024

73 Titular/es:

JUNO THERAPEUTICS, INC. (100.0%)

400 Dexter Avenue North, Suite 1200

Seattle, WA 98109, US

72 Inventor/es:

MUJACIC, MIRNA y

RAHARDJO, AYU

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

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

ES 2 959 953 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos para producir composiciones celulares genéticamente modificadas y composiciones relacionadas

5 Campo

[0001] La presente divulgación se refiere a métodos y composiciones para generar células modificadas genéticamente, tales como células que expresan un receptor recombinante, incluidos métodos que implican estimulación y/o ingeniería de una composición de entrada que tiene una proporción definida de células T CD4+ de tipo ingenuo a células T CD8+ de tipo ingenuo. células. En particular, los métodos se pueden usar para diseñar células T con receptores genéticamente modificados, tales como receptores de antígenos genéticamente modificados tales como TCR (recombinantes) modificados y receptores de antígenos quiméricos (CAR), u otros receptores quiméricos recombinantes. Las características de los métodos incluyen producir un producto de células T más consistente y/o predecible y/o un producto con menor toxicidad en comparación con otros métodos.

15 Antecedentes

[0002] Están disponibles varios métodos para preparar células para uso terapéutico y administrar las células. Por ejemplo, hay métodos disponibles para preparar células, incluidas células T, para ingeniería y terapia celular, incluidos métodos que implican el agotamiento o el enriquecimiento de ciertas subpoblaciones. Se necesitan métodos mejorados, por ejemplo, para reducir la toxicidad asociada con ciertas administraciones de terapia celular adoptiva, para mejorar el proceso de fabricación, para permitir una administración mejorada y/o para reducir costos u otros recursos. Se proporcionan métodos, células, composiciones, kits y sistemas que satisfacen dichas necesidades.

25 [0003] El documento WO2012/129514A1 describe métodos y composiciones para inmunoterapia.

[0004] Gardner y cols. (2017) Blood, 129(25):3322-3331, describe la remisión de la leucemia por intención de tratar mediante células T con CAR CD19 de formulación y dosis definidas en niños y adultos jóvenes.

30 [0005] Ali y col. (2016) Blood, 128(1 1688-1700, describe cómo las células T que expresan un receptor de antígeno quimérico anti-maduración de células B causan remisiones del mieloma múltiple.

[0006] Turtle et al. (2016) J Clin Invest, 126(6):2123-2138, describe células CAR-T CD19 de composición CD4+:CD8+ definida en pacientes adultos con LLA de células B.

35 Resumen

[0007] La presente invención se establece en el conjunto de reivindicaciones adjunto.

40 [0008] En el presente documento se proporciona un método para generar una composición de células que incluye (a) combinar una primera composición de células que contiene células T CD4+ de tipo ingenuo con una segunda composición de células que contiene células T CD8+ de tipo ingenuo para producir una composición de células de entrada en la que la proporción de células T CD8+ de tipo ingenuo - de células T CD4+ a células T CD8+ de tipo ingenuo está entre o aproximadamente entre 0,8:1 y 2,2:1, inclusive,

45 en donde la relación se ha determinado basándose en el número, número por volumen, número por peso o porcentaje de células T CD4+ de tipo ingenuo a células T CD4+ de tipo ingenuo en la primera composición de células y el número, número por volumen, número por peso o porcentaje de células T CD8+ de tipo ingenuo en la segunda composición de células, en donde las células CD4+ de tipo ingenuo:

- 50 (i) son de superficie positivo para CD45RA y CCR7;
(ii) son CD27 y CCR7 positivos en superficie; o
(iii) son positivas en superficie para CCR7 y negativas en superficie para CD62L; y

55 en el que las células CD8+ de tipo ingenuo:

- (i) son positivas en superficie para CD45RA y CCR7;
(ii) son CD27 y CCR7 positivos en superficie; o
(iii) son positivas en superficie para CCR7 y negativas en superficie para CD62L; y

60 (b) poner en contacto la composición de células de entrada con un agente que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un receptor recombinante en condiciones para introducir la molécula de ácido nucleico que codifica el receptor recombinante en las células de la composición de células de entrada. En algunas formas de realización, la primera composición de células se produce aislando células T CD4+ de una muestra biológica obtenida de un sujeto y/o la segunda composición de células se produce aislando células T CD8+ de la muestra biológica obtenida de un sujeto.

[0009] En algunas formas de realización, antes de la combinación, el método incluye determinar el número, número por volumen, número por peso y/o porcentaje de células T CD4+ de tipo ingenuo en la primera composición de células y/o el número, número por volumen, número por peso y/o porcentaje de células T CD8+ de tipo ingenuo en la segunda composición. En algunos casos, antes de la combinación, el método incluye determinar el número, número por volumen, número por peso y/o porcentaje de células T CD4+ de tipo ingenuo y/o el número, número por volumen, número por peso, y/o porcentaje de células T CD8+ de tipo ingenuo en la muestra biológica del sujeto. En algunas de tales formas de realización, la proporción de células T CD4+ de tipo ingenuo con respecto a células T CD8+ de tipo ingenuo en la composición de entrada se ajusta o altera en comparación con la proporción de células T CD4+ de tipo ingenuo con respecto a células T CD4+ de tipos de tipo ingenuo y de tipo ingenuo. como células T CD8+ en la muestra biológica del sujeto.

[0010] En algunas formas de realización, el método incluye determinar el número, número por volumen, número por peso y/o porcentaje de células T CD4+ de tipo ingenuo y células T CD8+ de tipo ingenuo en una muestra biológica obtenida de un sujeto o en uno o más muestras derivadas de los mismos; y producir una composición de entrada que contiene células T CD4+ y células T CD8+ en la que la proporción de células T CD4+ de tipo ingenuo a células T CD8+ de tipo ingenuo está entre o aproximadamente entre 2,2:1 y 0,8:1, inclusive, en la que dicha relación en la composición de entrada se ajusta o altera en comparación con la proporción de células T CD4+ de tipo ingenuo con respecto a células T CD8+ de tipo ingenuo en la muestra biológica del sujeto.

[0011] En la invención, el método incluye poner en contacto la composición de entrada con un agente que contiene una molécula de ácido nucleico que codifica un receptor recombinante en condiciones para introducir el ácido nucleico que codifica el receptor recombinante en las células de la composición de entrada.

[0012] En la invención, el método incluye poner en contacto una composición de entrada que contiene células T CD4+ de tipo ingenuo y células T CD8+ de tipo ingenuo de una muestra biológica de un sujeto con un agente que contiene una molécula de ácido nucleico que codifica un receptor recombinante en condiciones para introducir el ácido nucleico. ácido que codifica el receptor recombinante en células de la composición, en donde la proporción de células T CD4+ de tipo ingenuo a células T CD8+ de tipo ingenuo presentes en la composición de entrada está entre o aproximadamente entre 0,8:1 y 2,2:1, inclusive.

[0013] En algunas formas de realización, el método incluye además estimular las células, antes, durante y/o después de dicho contacto, en donde la estimulación incluye incubar las células en presencia de uno o más agentes estimulantes, en donde la estimulación da como resultado la activación y/o proliferación de las células.

[0014] En algunas formas de realización, el método incluye combinar una primera composición de células que contiene células T CD4+ de tipo ingenuo con una segunda composición de células que contiene células T CD8+ de tipo ingenuo para producir una composición de células de entrada en la que la proporción de células T CD4+ de tipo ingenuo a células T CD8+ de tipo ingenuo están entre o aproximadamente entre 0,8:1 y 2,2:1, inclusive; poner en contacto la composición de entrada con un agente que contiene una molécula de ácido nucleico que codifica un receptor recombinante en condiciones para introducir el ácido nucleico que codifica el receptor recombinante en las células de la composición; y estimular las células, antes, durante y/o después de dicho contacto, donde la estimulación incluye incubar las células en presencia de uno o más agentes estimulantes, donde la estimulación da como resultado la activación y/o proliferación de las células.

[0015] En la invención, las células CD4+ de tipo ingenuo (i) son positivas en superficie para CD45RA y CCR7; (ii) son positivas en superficie para CD27 y CCR7; o (iii) son positivas en superficie para CCR7 y negativas en superficie para CD62L; y las células CD8+ de tipo ingenuo (i) son positivas en superficie para CD45RA y CCR7; (ii) son positivas en superficie para CD27 y CCR7; o (iii) son positivas en superficie para CCR7 y negativas en superficie para CD62L. En algunas de dichas formas de realización, las células CD4+ de tipo ingenuo y/o las células CD8+ de tipo ingenuo son positivas en superficie para un marcador seleccionado del grupo que consiste en CD45RA, CD27, CD28, CD62L y CCR7; y/o son negativas en superficie para un marcador seleccionado del grupo que consiste en CD25, CD45RO, CD56, KLRG1; y/o tener baja expresión de CD95; y/o son negativas para la expresión intracelular de una citoquina seleccionada del grupo que consiste en IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-10. En algunas formas de realización, las células CD4+ de tipo ingenuo y/o las células CD8+ de tipo ingenuo son positivas en superficie para un marcador de activación de células T seleccionado del grupo que consiste en CD45RA, CD27, CD28 y CCR7; y/o son negativas en superficie para un marcador seleccionado del grupo que consiste en CD45RO, CD56, KLRG1; y/o tener baja expresión de CD95. En algunos aspectos, las células CD4+ de tipo ingenuo y/o las células CD8+ de tipo ingenuo son positivas en superficie para CD45RA y CCR7. En algunas formas de realización, las células CD4+ de tipo ingenuo y CD8+ de tipo ingenuo tienen una superficie positiva para CD45RA, CD27 y CCR7 y una superficie negativa para CD45RO.

[0016] En algunas de dichas formas de realización, el número, el número por volumen, el número por peso y/o el porcentaje de células T CD4+ de tipo ingenuo y/o el número, el número por volumen, el número por peso y/o el porcentaje de células T CD4+ de tipo ingenuo. como las células T CD8+ se determina mediante citometría de flujo. En algunos aspectos, la proporción de células T CD4+ de tipo ingenuo y células T CD8+ de tipo ingenuo se ha ajustado en comparación con la proporción de células T CD4+ de tipo ingenuo y células T CD8+ de tipos de tipo ingenuo en una muestra biológica del sujeto.

[0017] En algunas formas de realización, la muestra biológica es o se obtiene de una muestra de sangre, plasma o suero. En algunos aspectos, la muestra biológica es o incluye una muestra de sangre completa, una muestra de capa leucocitaria, una muestra de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), una muestra de células T no fraccionadas, una muestra de linfocitos, una muestra de glóbulos blancos, un producto de aféresis, o un producto de leucoféresis. En algunos casos, la muestra biológica es o se obtiene a partir de una muestra de aféresis o leucoféresis. En algunas formas de realización, el sujeto es un sujeto humano.

[0018] En algunas de dichas formas de realización, la composición de entrada contiene una proporción de células CD4+ de tipo ingenuo a células CD8+ de tipo ingenuo de entre o aproximadamente entre 0,8:1 y 2,0:1, 0,8:1 y 1,6:1, 0,8:1 y 1,4:1, 0,8:1 y 1,2:1 o 1,0:1 y 1,2:1, cada uno inclusive. En algunas formas de realización, la composición de entrada incluye una proporción de células CD4+ de tipo ingenuo a células CD8+ de tipo ingenuo de o aproximadamente 1,5:1, 1,4:1, 1,3:1, 1,2:1, 1,1:1 o 1,0:1. En algunas formas de realización, la composición de entrada contiene una proporción de células CD4+ de tipo ingenuo a células CD8+ de tipo ingenuo de o aproximadamente 1,1:1.

[0019] En algunas de dichas formas de realización, la composición de entrada contiene de o desde aproximadamente 1×10^7 a 5×10^9 células totales o células T totales, de o desde aproximadamente 5×10^7 a 1×10^9 células totales o células T totales, de o desde aproximadamente 1×10^8 a 5×10^8 células totales o células T totales, o desde o desde aproximadamente 2×10^8 a 5×10^8 células totales o células T totales, o de poblaciones viables de cualquiera de los anteriores. En algunos casos, la composición de entrada contiene al menos o al menos aproximadamente 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 o 5×10^8 células totales o células T totales o una población viable de cualquiera de los anteriores.

[0020] En algunas formas de realización, uno o más agentes estimulantes son capaces de activar células T, células T CD4+ y/o células T CD8+; es capaz de inducir una señal a través de un complejo TCR; y/o es capaz de inducir la proliferación de células T, células T CD4+ y/o células T CD8+. En algunos aspectos, uno o más agentes estimulantes contienen un agente primario que se une a un miembro de un complejo de TCR, opcionalmente que se une específicamente a CD3. En algunos casos, uno o más agentes estimulantes contienen además un agente secundario que se une específicamente a una molécula coestimuladora de células T. En algunos ejemplos, la molécula coestimuladora se selecciona del grupo que consiste en CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 o ICOS.

[0021] En algunas formas de realización, los agentes primarios y secundarios contienen anticuerpos, opcionalmente en los que uno o más agentes estimulantes incluyen la incubación con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28. En algunas formas de realización, uno o más agentes estimulantes están presentes en la superficie de un soporte sólido, opcionalmente una perla. En algunas formas de realización, uno o más agentes estimulantes están presentes en la superficie de una perla y la perla es una perla paramagnética. En algunos aspectos, uno o más agentes estimulantes se seleccionan del grupo que consiste en moléculas de unión a CD3; moléculas de unión a CD28; IL-2 recombinante; IL-15 recombinante; e IL-7 recombinante, una vacuna que contiene un antígeno específicamente reconocido por el receptor de antígeno y un anticuerpo antiidiotipo que se une específicamente al receptor de antígeno o combinaciones de los mismos.

[0022] En algunas de tales formas de realización, la incubación se lleva a cabo durante 2 a 15 días, 2 a 12 días, 2 a 12 días, 2 a 8 días, 2 a 6 días, 2 a 4 días, 4 a 12 días, 4 a 12 días. 10 días, 4 a 8 días, 4 a 6 días, 6 a 12 días, 6 a 10 días, 6 a 8 días, 8 a 12 días, 8 a 10 días o 10 a 12 días. En algunos casos, la incubación se lleva a cabo durante al menos o aproximadamente al menos 4 días, 6 días, 8 días, 10 días o 12 días.

[0023] En algunas de dichas formas de realización, el agente que contiene la molécula de ácido nucleico es un vector viral o es un transposón. En algunos casos, el agente que contiene la molécula de ácido nucleico es un vector viral y el vector viral es un vector retroviral. En algunos ejemplos, el vector viral es un vector lentiviral o un vector gammaretroviral.

[0024] En algunas formas de realización, el receptor recombinante es capaz de unirse a un antígeno diana que está asociado con, específico y/o expresado en una célula o tejido de una enfermedad, trastorno o afección. En algunos casos, la enfermedad, trastorno o afección es una enfermedad o trastorno infeccioso, una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria, un tumor o un cáncer. En algunos casos, el antígeno diana es un antígeno tumoral. En algunos ejemplos, el antígeno diana se selecciona entre ROR1, antígeno de maduración de células B (BCMA), anhidrasa carbónica 9 (CAIX), tEGFR, Her2/neu (receptor tirosina quinasa erbB2), CD19, CD20, CD22, mesotelina, CEA, y antígeno de superficie de la hepatitis B, receptor antifolato, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, glicoproteína epitelial 2 (EPG-2), glicoproteína epitelial 40 (EPG-40), EPHA2, erb-B2, erb-B3, erb-B4, dímeros de erbB, EGFR VIII, proteína de unión a folato (FBP), FCRL5, FCRH5, receptor de acetilcolina fetal, GD2, GD3, receptor acoplado a proteína G 5D (GPCRSD, HMW-MAA, IL-22R-alfa, receptor de dominio de inserción de quinasa (kdr), cadena ligera kappa, Lewis Y, molécula de adhesión de células LI (LI-CAM), antígeno asociado al melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, antígeno de melanoma expresado preferentemente (PRAME), survivina, TAG72, B7-H6, receptor alfa 2 de IL-13 (IL-13Ra2), CA9, GD3, HMW-MAA, CD171, G250/CAIX, PSCA, receptor a de folato, CD44v6, CD44v7/8, integrina avb6, 8H9, NCAM, receptores VEGF, 5T4, AchR fetal, ligandos NKG2D, CD44v6, antígeno dual, un antígeno de cáncer de testículo, mesotelina, CMV murino, mucina 1 (MUC1), MUC16, PSCA, NKG2D, NY-ESO-1,

MART-1, gp100, antígeno oncofetal, ROR1, TAG72, VEGF-R2, antígeno carcinoembrionario (CEA), Her2/neu, receptor de estrógeno, receptor de progesterona, efrinaB2, CD123, c-Met, GD-2, O- GD2 acetilado (OGD2), CE7, tumor de Wilms 1 (WT-1), una ciclina, ciclina A2, CCL-1, CD138, un antígeno específico de patógeno y un antígeno asociado con una etiqueta universal.

[0025] En algunos ejemplos, el antígeno diana se selecciona entre el receptor huérfano tipo tirosina quinasa 1 (ROR1), el antígeno de maduración de células B (BCMA), la anhidrasa carbónica 9 (CA9, también conocida como CAIX o G250), Her2/neu (receptor de tirosina quinasa), quinasa erbB2, CD19, CD20, CD22, mesotelina (MSLN), antígeno carcinoembrionario (CEA) y antígeno de superficie de la hepatitis B, receptor antifolato, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, proteoglicano de sulfato de condroitina 4 (CSPG4), EGFR, glicoproteína epitelial 2 (EPG-2), glicoproteína epitelial 40 (EPG-40), receptor de efrina A2 (EPHa2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), dímeros de erbB, crecimiento epidérmico tipo III mutación del receptor del factor (EGFR vIII), proteína de unión a folato (FBP), receptor de Fc tipo 5 (FCRL5, también conocido como homólogo 5 del receptor de Fc o FCRH5), receptor de acetilcolina fetal (AChR fetal), gangliósido GD2, gangliósido GD3, antígeno leucocitario humano A1 (HLA-A1), antígeno leucocitario humano A2 (HLA-A2), receptor alfa de IL-22 (IL-22Ra), receptor de dominio de inserción de quinasa (kdr), cadena ligera kappa, repetición rica en leucina que contiene 8 miembros de la familia A (LRRC8A), Lewis Y, molécula de adhesión de células LI (LI-CAM), antígeno asociado al melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, antígeno de melanoma expresado preferentemente (PRAME), survivina, tumor- glicoproteína asociada 72 (TAG72), B7-H3, B7-H6, receptor alfa 2 de IL-13 (IL-13Ra2), antígeno asociado al melanoma de alto peso molecular humano (HMW-MAA), CDI 71, receptor alfa de folato, CD44v7/8, integrina $\alpha\beta 6$ (integrina $\alpha v\beta 6$), 8H9, molécula de adhesión de células neurales (NCAM), receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (receptores VEGF o VEGFR), glicoproteína del trofoblasto (TPBG también conocida como 5T4), ligandos NKG2D, CD44v6, dual antígeno, un antígeno de cáncer de testículo, citomegalovirus murino (CMV), mucina 1 (MUC1), MUC16, antígeno de células madre de próstata (PSCA), antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), ligandos del miembro D del grupo 2 del asesino natural (NKG2D), cáncer /antígeno testicular IB (CTAG, también conocido como NY-ESO-1 y LAGE-2), melan A (MART-1), glicoproteína 100 (gp100), glicoproteína 3 (GPC3), receptor acoplado a proteína G 5D (GPRC5D), antígeno oncofetal, TAG72, proteína 1 relacionada con la tirosinasa (TRP1, también conocida como TYRP1 o gp75), proteína 2 relacionada con la tirosinasa (TRP2, también conocida como dopacromo tautomerasa, dopacromo delta-isomerasa o DCT), receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)-R2, antígeno carcinoembrionario (CEA), receptor de estrógeno, receptor de progesterona, un antígeno prostático específico, efrina B2, CD123, CD133, c-Met, GD2 O-acetilado (OGD2), epítipo CE7 de LI-CAM, tumor de Wilms 1 (WT). -1), una ciclina, ciclina A2, ligando de quimiocina con motivo CC 1 (CCL-1), CD138, un antígeno específico de patógeno o antígeno expresado por patógeno y un antígeno asociado con una etiqueta universal y/o moléculas biotiniladas, y/ o moléculas expresadas por VIH, VHC, VHB u otros patógenos.

[0026] Los antígenos a los que se dirigen los receptores en algunas formas de realización incluyen antígenos asociados con una enfermedad maligna de células B, tal como cualquiera de varios marcadores de células B conocidos. En algunas formas de realización, el antígeno es o incluye CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Igkappa, Iglambda, CD79a, CD79b o CD30.

[0027] En algunas formas de realización, el antígeno es o incluye un antígeno específico de patógeno o expresado por patógeno. En algunas formas de realización, el antígeno es un antígeno viral (tal como un antígeno viral del VIH, VHC, VHB, etc.), antígenos bacterianos y/o antígenos parásitos.

[0028] En algunas formas de realización, el receptor recombinante es o contiene un receptor de antígeno no TCR funcional o un TCR o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunas formas de realización, el receptor recombinante es un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunos casos, el receptor de antígeno quimérico contiene un componente extracelular que contiene un componente de unión al antígeno. En algunos casos, el dominio de unión al antígeno es o contiene un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo, que opcionalmente es un fragmento de cadena única. En algunas formas de realización, el fragmento contiene regiones variables de anticuerpo unidas por un conector flexible. En algunos aspectos, el fragmento contiene un scFv.

[0029] En algunas formas de realización, el receptor de antígeno quimérico contiene además un espaciador y/o una región bisagra. En algunas formas de realización, el receptor de antígeno quimérico contiene una región de señalización intracelular. En algunos casos, la región de señalización intracelular contiene un dominio de señalización intracelular. En algunas formas de realización, el componente de señalización intracelular es o contiene un componente de señalización principal, un componente de señalización que es capaz de inducir una señal de activación primaria en una célula T, un componente de receptor de células T (TCR) y/o un dominio de señalización que contiene un elemento de activación basado en tirosina (ITAM) de inmunorreceptores. En algunas formas de realización, el dominio de señalización intracelular es o contiene un dominio de señalización intracelular de una cadena CD3, opcionalmente una cadena CD3-zeta (CD3), o una parte de señalización de la misma.

[0030] En algunas formas de realización, el CAR comprende un scFv específico para el antígeno, un dominio trans membrana, un dominio de señalización citoplasmática derivado de una molécula coestimuladora, que opcionalmente es o comprende un 4-1BB, y un dominio de señalización citoplasmático derivado de una molécula que contiene ITAM de señalización primario, que opcionalmente es o comprende un dominio de señalización CD3zeta y

opcionalmente comprende además un espaciador entre el dominio transmembranal y el scFv; el CAR comprende, en orden, un scFv específico para el antígeno, un dominio transmembrana, un dominio de señalización citoplasmática derivado de una molécula coestimuladora, que opcionalmente es o comprende un dominio de señalización 4-1BB, y un dominio de señalización citoplasmática derivado de una molécula que contiene ITAM de señalización primario, que

[0031] En algunas formas de realización, el receptor de antígeno quimérico contiene además un dominio transmembrana dispuesto entre el dominio extracelular y la región de señalización intracelular. En algunas formas de realización, la región de señalización intracelular contiene además una región de señalización coestimuladora. En algunos aspectos, la región de señalización coestimuladora contiene un dominio de señalización intracelular de una molécula coestimuladora de células T o una parte de señalización de la misma. En algunos ejemplos, la región de señalización coestimuladora contiene un dominio de señalización intracelular de un CD28, un 4-1BB o un ICOS o una parte de señalización de los mismos. En algunas formas de realización, la región de señalización coestimuladora está entre el dominio transmembrana y la región de señalización intracelular.

[0032] En algunas de dichas formas de realización, el sujeto tiene una enfermedad o afección, opcionalmente en la que el receptor recombinante reconoce específicamente o se une específicamente a un antígeno asociado con, o expresado o presente en células de la enfermedad o afección.

[0033] En algunas formas de realización, el método produce una composición de salida en la que la proporción de células T CD4+ que expresan receptores recombinantes con respecto a células T CD8+ que expresan receptores recombinantes, opcionalmente la proporción de células viables de las mismas, varía en no más del 20 % o no más del 10 % o no más del 5 % de un promedio de dicha proporción en una pluralidad de composiciones de células T producidas mediante el método y/o varía de dicho promedio en no más de una desviación estándar. En algunas formas de realización, el método produce una composición de salida en la que la proporción de células T CD4+ que expresan receptores recombinantes a células T CD8+ que expresan receptores recombinantes, opcionalmente la proporción de células viables de las mismas, está entre o aproximadamente 0,5:1 y 2:1 o 0,8:1 y 1,6:1 o 1:1 y 1,5:1, cada uno inclusive. En algunos ejemplos, la proporción de células T CD4+ que expresan receptores recombinantes con respecto a células T CD8+ que expresan receptores recombinantes, opcionalmente la proporción de células viables de las mismas, en la composición de salida es o es aproximadamente 1,2:1, 1,1:1, 1:1, 0,9:1 o 0,8:1. En algunos casos, la proporción de células T CD4+ que expresan receptores recombinantes con respecto a células T CD8+ que expresan receptores recombinantes, opcionalmente la proporción de células viables de las mismas, en la composición de salida es o es aproximadamente 1:1.

[0034] En algunas formas de realización, las células viables contienen células que son negativas para el marcador apoptótico (-), opcionalmente en las que el marcador apoptótico es Anexina V o Caspasa 3 activa.

[0035] En la invención, el método se realiza in vitro o ex vivo.

[0036] En el presente documento se proporciona una composición de salida producida mediante el método de la invención. También se proporciona una composición farmacéutica que contiene la composición de salida descrita. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica contiene además un vehículo farmacéutico.

[0037] En el presente documento se divulga un método de tratamiento que incluye la administración a un sujeto animal de una composición de salida producida por cualquiera de los métodos descritos o cualquiera de las composiciones farmacéuticas descritas. Las células pueden derivarse del sujeto al que se administran las células.

[0038] En ciertas formas de realización de los métodos proporcionados, las células CD4+ de tipo ingenuo y/o las células CD8+ de tipo ingenuo son positivas en superficie para CD45RA y CCR7. En algunas formas de realización de los métodos proporcionados, las células CD4+ de tipo ingenuo y/o las células CD8+ de tipo ingenuo son positivas en superficie para CD27 y CCR7. En formas de realización particulares de los métodos proporcionados, las células CD4+ de tipo ingenuo y CD8+ de tipo ingenuo tienen una superficie positiva para CD45RA, CD27 y CCR7 y una superficie negativa para CD45RO.

[0039] En ciertas formas de realización de los métodos proporcionados, las células CD4+ de tipo ingenuo y/o las células CD8+ de tipo ingenuo tienen una superficie positiva para CCR7 y una superficie negativa para CD62L. En algunas formas de realización de los métodos proporcionados, la composición de entrada comprende una proporción de células CD4+ de tipo ingenuo a células CD8+ de tipo ingenuo que son positivas en superficie para CD45RA y CCR7 de o aproximadamente 1,1:1. En formas de realización particulares de los métodos proporcionados, la composición de entrada comprende una proporción de células CD4+ de tipo ingenuo a células CD8+ de tipo ingenuo que son positivas en superficie para CD45RA y CD27 de o aproximadamente 1,69:1. En algunas formas de realización, la

composición de células de entrada comprende una proporción de células CD4⁺ de tipo ingenuo a células CD8⁺ de tipo ingenuo que son positivas en superficie para CD27 y CCR7 de o aproximadamente 1,69:1.

[0040] En ciertas formas de realización, el método comprende: combinar una primera composición de células que comprende células T CCR7+CD45RA+CD4⁺ con una segunda composición de células que comprende células T CCR7+CD45RA+CD8⁺ para producir una composición de células de entrada en la que la proporción de CCR7+CD45RA+CD4⁺ a células T CCR7+CD45RA+CD8⁺ está entre o aproximadamente entre 0,8:1 y 2,2:1, inclusive. En algunas formas de realización de los métodos proporcionados, la primera composición de células se produce aislando células T CD4⁺ de una muestra biológica obtenida de un sujeto y/o la segunda composición de células se produce aislando células T CD8⁺ de la muestra biológica obtenida de un sujeto.

[0041] En formas de realización particulares de los métodos proporcionados, antes de la combinación, el método comprende la determinación del número, número por volumen, número por peso y/o porcentaje de células T CCR7+CD45RA+CD4⁺ en la primera composición de células y/o el número, número por volumen, número por peso y/o porcentaje de células T CCR7+CD45RA+CD8⁺ en la segunda composición. En ciertas formas de realización de los métodos proporcionados, antes de la combinación, el método comprende determinar el número, número por volumen, número por peso y/o porcentaje de las células T CCR7+CD45RA+CD4⁺ y/o el número, número por volumen, número por peso, y/o porcentaje de células T CCR7+CD45RA+CD8⁺ en la muestra biológica del sujeto. En algunas formas de realización de los métodos proporcionados, la proporción de células T CCR7+CD45RA+CD4⁺ a células T CCR7+CD45RA+CD8⁺ en la composición de entrada se ajusta o altera en comparación con la proporción de células T CCR7+CD45RA+CD4⁺ a células T CCR7+CD45RA+CD8⁺ en la muestra biológica del sujeto.

[0042] En formas de realización particulares, el método comprende: determinar el número, número por volumen, número por peso y/o porcentaje de células T CCR7+CD45RA+CD4⁺ y células T CCR7+CD45RA+CD8⁺ en una muestra biológica obtenida de un sujeto o en una o más muestras derivadas del mismo; y producir una composición de entrada que comprende células T CD4⁺ y células T CD8⁺ en la que la proporción de células T CCR7+CD45RA+CD4⁺ a células T CD8⁺ de tipo ingenuo está entre o aproximadamente entre 2,2:1 y 0,8:1, inclusive, en la que dicha proporción en la composición de entrada se ajusta o altera en comparación con la proporción de células T CCR7+CD45RA+CD4⁺ con respecto a células T CD8⁺ de tipo ingenuo en la muestra biológica del sujeto.

[0043] En la invención, los métodos proporcionados comprenden poner en contacto la composición de entrada con un agente que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un receptor recombinante en condiciones para introducir el ácido nucleico que codifica el receptor recombinante en las células de la composición de entrada.

[0044] En algunas formas de realización, el método comprende: poner en contacto una composición de entrada que comprende células T CCR7+CD45RA+CD4⁺ y células T CCR7+CD45RA+CD8⁺ de una muestra biológica de un sujeto con un agente que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un receptor recombinante en condiciones para introducir el ácido nucleico que codifica el receptor recombinante en las células de la composición, en donde la proporción de células T CCR7+CD45RA+CD4⁺ a células T CCR7+CD45RA+CD8⁺ presentes en la composición de entrada está entre o aproximadamente entre 0,8:1 y 2,2:1, inclusive. En algunas formas de realización de los métodos proporcionados, comprenden además estimular las células, antes, durante y/o después de dicho contacto, en donde la estimulación comprende incubar las células en presencia de uno o más agentes estimulantes, en donde la estimulación da como resultado la activación y/o proliferación de las células.

[0045] En formas de realización particulares, el método comprende: combinar una primera composición de células que comprende células T CCR7+CD45RA+CD4⁺ con una segunda composición de células que comprende células T CCR7+CD45RA+CD8⁺ para producir una composición de células de entrada en la que la proporción de células T CCR7+CD45RA+CD4⁺ a células T CCR7+CD45RA+CD8⁺ está entre o aproximadamente entre 0,8:1 y 2,2:1, inclusive; poner en contacto la composición de entrada con un agente que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un receptor recombinante en condiciones para introducir el ácido nucleico que codifica el receptor recombinante en las células de la composición; y estimular las células, antes, durante y/o después de dicho contacto, donde estimular comprende incubar las células en presencia de uno o más agentes estimulantes, donde la estimulación da como resultado la activación y/o proliferación de las células.

[0046] En ciertas formas de realización de los métodos proporcionados, el número, número por volumen, número por peso y/o porcentaje de células T CCR7+CD45RA+CD4⁺ y/o el número, número por volumen, número por peso y/o porcentaje de las células T CCR7+CD45RA+CD8⁺ se determinan mediante citometría de flujo. En algunas formas de realización de los métodos proporcionados, la proporción de células T CCR7+CD45RA+CD4⁺ a células T CCR7+CD45RA+CD8⁺ se ha ajustado en comparación con la proporción de células T CCR7+CD45RA+CD4⁺ a células T CCR7+CD45RA+CD8⁺ en una muestra biológica del sujeto. En formas de realización particulares de los métodos proporcionados, la composición de entrada comprende una proporción de células CCR7+CD45RA+CD4⁺ a células CCR7+CD45RA+CD8⁺ de entre o aproximadamente entre 0,8:1 y 2,0:1, 0,8:1 y 1,6:1, 0,8:1 y 1,4:1, 0,8:1 y 1,2:1, o 1,0:1 y 1,2:1, cada uno inclusive. En ciertas formas de realización de los métodos proporcionados, la composición de entrada comprende una proporción de células CCR7+CD45RA+CD4⁺ a células CCR7+CD45RA+CD8⁺ de o aproximadamente 1,5:1, 1,4:1, 1,3:1, 1,2:1, 1,1:1. o 1,0:1.

[0047] En algunas formas de realización de los métodos proporcionados, la composición de entrada comprende una proporción de células CCR7+CD45RA+CD4+ a células CCR7+CD45RA+CD8+ de o aproximadamente 1,1:1. En formas de realización particulares, el método comprende: combinar una primera composición de células que comprende células T CD27+CCR7+CD4+ con una segunda composición de células que comprende células T CD27+CCR7+CD8+ para producir una composición de células de entrada en la que la proporción de las células T CD27+CCR7+CD4+ a las células T CD27+CCR7+CD8+ están entre o aproximadamente entre 0,8:1 y 2,2:1, inclusive.

[0048] En ciertas formas de realización de los métodos proporcionados, la primera composición de células se produce aislando células T CD4+ de una muestra biológica obtenida de un sujeto y/o la segunda composición de células se produce aislando células T CD8+ de la muestra biológica obtenida del sujeto. En algunas formas de realización de los métodos proporcionados, antes de la combinación, el método comprende determinar el número, número por volumen, número por peso y/o porcentaje de las células T CD27+CCR7+CD4+ en la primera composición de células y/o el número, número por volumen, número por peso y/o porcentaje de células T CD27+CCR7+CD8+ en la segunda composición. En formas de realización particulares de los métodos proporcionados, antes de la combinación, el método comprende determinar el número, número por volumen, número por peso y/o porcentaje de las células T CD27+CCR7+CD4+ y/o el número, número por volumen, número por peso y/o porcentaje de células T CD27+CCR7+CD8+ en la muestra biológica del sujeto.

[0049] En ciertas formas de realización de los métodos proporcionados, la proporción de células T CD27+CCR7+CD4+ a células T CD27+CCR7+CD8+ en la composición de entrada se ajusta o altera en comparación con la proporción de células T CD27+CCR7+CD4+ a células T CD27+CCR7+CD8+ en la muestra biológica del sujeto. En ciertas formas de realización, se proporciona en el presente documento un método para generar una composición de células, comprendiendo el método: determinar el número, número por volumen, número por peso y/o porcentaje de células T CD27+CCR7+CD4+ y células T CD27+CCR7+CD8+ en una muestra biológica obtenida de un sujeto o en una o más muestras derivadas del mismo; y producir una composición de entrada que comprende células T CD4+ y células T CD8+ en la que la proporción de células T CD27+CCR7+CD4+ a células T CD8+ de tipo ingenuo está entre o aproximadamente entre 2,2:1 y 0,8:1, inclusive, en la que dicha proporción en la composición de entrada se ajusta o altera en comparación con la proporción de células T CD27+CCR7+CD4+ a células T CD8+ de tipo ingenuo en la muestra biológica del sujeto.

[0050] En la invención, los métodos proporcionados comprenden poner en contacto la composición de entrada con un agente que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un receptor recombinante en condiciones para introducir el ácido nucleico que codifica el receptor recombinante en las células de la composición de entrada.

[0051] En formas de realización particulares, el método comprende: poner en contacto una composición de entrada que comprende células T CD27+CCR7+CD4+ y células T CD27+CCR7+CD8+ de una muestra biológica de un sujeto con un agente que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un receptor recombinante en condiciones para introducir el ácido nucleico que codifica el receptor recombinante en las células de la composición, en donde la proporción de células T CD27+CCR7+CD4+ a células T CD27+CCR7+CD8+ presentes en la composición de entrada está entre o aproximadamente entre 0,8:1 y 2,2:1, inclusive. Ciertas formas de realización de los métodos proporcionados comprenden además estimular las células, antes, durante y/o después de dicho contacto, en donde estimular comprende incubar las células en presencia de uno o más agentes estimulantes, en donde la estimulación da como resultado la activación y/o proliferación de las células.

[0052] En algunas formas de realización, el método comprende: combinar una primera composición de células que comprende células T CD27+CCR7+CD4+ con una segunda composición de células que comprende células T CD27+CCR7+CD8+ para producir una composición de células de entrada en la que la proporción de células T CD27+CCR7+CD4+ a células T CD27+CCR7+CD8+ está entre o aproximadamente entre 0,8:1 y 2,2:1, inclusive; poner en contacto la composición de entrada con un agente que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un receptor recombinante en condiciones para introducir el ácido nucleico que codifica el receptor recombinante en las células de la composición; y estimular las células, antes, durante y/o después de dicho contacto, donde estimular comprende incubar las células en presencia de uno o más agentes estimulantes, donde la estimulación da como resultado la activación y/o proliferación de las células.

[0053] En formas de realización particulares de los métodos proporcionados, el número, número por volumen, número por peso y/o porcentaje de células T CD27+CCR7+CD4+ y/o el número, número por volumen, número por peso y/o porcentaje de las células T CD27+CCR7+CD8+ se determinan mediante citometría de flujo. En ciertas formas de realización de los métodos proporcionados, la proporción de células T CD27+CCR7+CD4+ a células T CD27+CCR7+CD8+ se ha ajustado en comparación con la proporción de células T CD27+CCR7+CD4+ a células T CD27+CCR7+CD8+ en una muestra biológica del sujeto.

[0054] En algunas formas de realización de los métodos proporcionados, la composición de entrada comprende una proporción de células CD27+CCR7+CD4+ a células CD27+CCR7+CD8+ de entre o aproximadamente entre 0,8:1 y 2,0:1, 0,8:1 y 1,6:1, 0,8:1 y 1,4:1, 0,8:1 y 1,2:1, o 1,0:1 y 1,2:1, cada uno inclusive. En formas de realización particulares de los métodos proporcionados, la composición de entrada comprende una proporción de células CD27+CCR7+CD4+ a células CD27+CCR7+CD8+ de o aproximadamente 1,5:1, 1,4:1, 1,3:1, 1,2:1, 1,1:1, o 1,0:1. En

ciertas formas de realización de los métodos proporcionados, la composición de entrada comprende una proporción de células CD27+CCR7+CD4+ a células CD27+CCR7+CD8+ de o aproximadamente 1,1:1. En algunas formas de realización, la composición de células de entrada comprende una proporción de células CD27+CCR7+CD4+ a células CD27+CCR7+CD8+ de o aproximadamente 1,69:1.

[0055] En algunas formas de realización, el método comprende: combinar una primera composición de células que comprende células T CD62L-CCR7+CD4+ con una segunda composición de células que comprende células T CD62L-CCR7+CD8+ para producir una composición de células de entrada en la que la proporción de células T CD62L-CCR7+CD4+ a células T CD62L-CCR7+CD8+ está entre o aproximadamente entre 0,8:1 y 2,2:1, inclusive.

[0056] En formas de realización particulares, el método comprende: determinar el número, número por volumen, número por peso y/o porcentaje de células T CD62L-CCR7+CD4+ y células T CD62L-CCR7+CD8+ en una muestra biológica obtenida de un sujeto o en una o más muestras derivadas del mismo; y producir una composición de entrada que comprende células T CD4+ y células T CD8+ en la que la proporción de células T CD62L-CCR7+CD4+ a células T CD8+ de tipo ingenuo está entre o aproximadamente entre 0,8:1 y 2,2:1, inclusive, en la que dicha proporción en la composición de entrada se ajusta o altera en comparación con la proporción de células T CD62L-CCR7+CD4+ a células T CD8+ de tipo ingenuo en la muestra biológica del sujeto.

[0057] En la invención, los métodos proporcionados comprenden además poner en contacto la composición de entrada con un agente que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un receptor recombinante en condiciones para introducir el ácido nucleico que codifica el receptor recombinante en las células de la composición de entrada. En algunas formas de realización, el método comprende: combinar una primera composición de células que comprende células T CD62L-CCR7+CD4+ con una segunda composición de células que comprende células T CD62L-CCR7+CD8+ para producir una composición de células de entrada en la que la proporción de CD62L-CCR7+CD4+ de células T a células T CD62L-CCR7+CD8+ está entre o aproximadamente entre 0,8:1 y 2,2:1, inclusive; poner en contacto la composición de entrada con un agente que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un receptor recombinante en condiciones para introducir el ácido nucleico que codifica el receptor recombinante en las células de la composición; y estimular las células, antes, durante y/o después de dicho contacto, donde estimular comprende incubar las células en presencia de uno o más agentes estimulantes, donde la estimulación da como resultado la activación y/o proliferación de las células.

[0058] En formas de realización particulares de los métodos proporcionados, el número, número por volumen, número por peso y/o porcentaje de células T CD62L-CCR7+CD4+ y/o el número, número por volumen, número por peso y/o porcentaje de las células T CD62L-CCR7+CD8+ se determinan mediante citometría de flujo. En ciertas formas de realización de los métodos proporcionados, la proporción de células T CD62L-CCR7+CD4+ a células T CD62L-CCR7+CD8+ se ha ajustado en comparación con la proporción de células T CD62L-CCR7+CD4+ a células T CD62L-CCR7+CD8+ en una muestra biológica del sujeto. En algunas formas de realización de los métodos proporcionados, la composición de entrada comprende una proporción de células CD62L-CCR7+CD4+ a células CD62L-CCR7+CD8+ de entre o aproximadamente entre 1:1 y 2:1, o 0,8:1 y 1,2:1, cada una de ellas, inclusive. En formas de realización particulares de los métodos proporcionados, la composición de entrada comprende una proporción de células CD62L-CCR7+CD4+ a células CD62L-CCR7+CD8+ de o aproximadamente 1,2:1, 1,1:1, 1,0:1, 0,9:1 o 0,8:1.

[0059] En ciertas formas de realización de los métodos proporcionados, la muestra biológica es o se obtiene de una muestra de sangre, plasma o suero. En algunas formas de realización de los métodos proporcionados, la muestra biológica es o comprende una muestra de sangre completa, una muestra de capa leucocítica, una muestra de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), una muestra de células T no fraccionadas, una muestra de linfocitos, una muestra de glóbulos blancos, un producto de aféresis o un producto de leucoféresis. En formas de realización particulares de los métodos proporcionados, la muestra biológica es o se obtiene a partir de una muestra de aféresis o leucoféresis.

Breve descripción de los dibujos

[0060]

FIG. 1A muestra un gráfico de análisis de ajuste bivariado de la proporción de células CD4+ viables a células CD8+ viables (proporción CD4+/CD8+ viable) en una muestra de aféresis en comparación con la proporción de células T CAR+CD4+ a células T CAR+CD8+ (proporción CAR+ CD4+/CD8+) en una composición de células T después de la activación de células T, la transducción con una construcción de receptor de antígeno quimérico (CAR) y la expansión. Las líneas curvas representan los límites de la elipse normal bivariada en $p=0,990$. Los puntos de datos representan las proporciones medias de cuatro muestras de cada sujeto, incluidos sujetos sanos (círculos) y un sujeto con mieloma (signo más).

FIG. 1B muestra un gráfico de análisis de ajuste bivariado de la proporción CD45RA+/CCR7+ CD4/CD8 en una mezcla inicial de células CD4 y CD8 seleccionadas en comparación con la proporción CAR+ CD4+/CD8+ en una composición de células T después de la activación de células T, transducción con un receptor de antígeno quimérico (CAR) construcción y ampliación. Las líneas curvas representan los límites de la elipse

normal bivariada en $p=0,990$. Los puntos de datos representan las proporciones medias de cuatro muestras de cada sujeto, incluidos sujetos sanos (círculos) y un sujeto con mieloma (signo más).

FIGS. 2A-2C muestran gráficos de análisis de ajuste bivariado de la proporción de células de diferentes fenotipos en una mezcla inicial de células CD4 y CDS seleccionadas en comparación con la proporción CAR+ CD4+/CD8+ en una composición de células T CAR+ diseñada. **FIG. 2A** muestra una gráfica de análisis de ajuste bivariado de la proporción de células CD45RA+/CCR7+/CD4+ a CD45RA+/CCR7+/CD8+ en una mezcla inicial de células CD4 y CD8 seleccionadas en comparación con la proporción CAR+ CD4+/CD8+ en una composición de células T CAR+ diseñada. **FIG. 2B** muestra una gráfica de análisis de ajuste bivariado de la proporción de células T CD62L-/CCR7+/CD4+ a células T CD62L-/CCR7+/CD8+ en una mezcla inicial de células CD4 y CD8 seleccionadas en comparación con la proporción CAR+ CD4+/CD8+ en una composición de células T CAR+ diseñada. **FIG. 2C** muestra una gráfica de análisis de ajuste bivariado de la proporción de células T CD27+/CCR7+/CD4+ a células T CD27+/CCR7+/CD8+ en una mezcla inicial de células CD4 y CD8 seleccionadas en comparación con la proporción CAR+ CD4+/CD8+ en una célula T CAR+ diseñada composición. Las líneas curvas representan los límites de la elipse normal bivariada en $p=0,950$. Los puntos de datos representan las proporciones medias de múltiples composiciones de cada sujeto, incluidos donantes sanos (círculos) y un paciente con mieloma múltiple (signos más).

FIGS. 3A-3C muestran gráficos de análisis de ajuste bivariado de la proporción de células de diferentes fenotipos en una mezcla inicial de células CD4 y CDS seleccionadas de siete donantes con mieloma múltiple en comparación con la proporción CAR+ CD4+/CD8+ en la composición de células T CAR+ diseñada generada. **FIG. 3A** muestra una gráfica de análisis de ajuste bivariado de la proporción de células CD27+/CCR 7+/CD4+ a CD27+/CCR7+/CD8+ en una mezcla inicial de células CD4 y CD8 seleccionadas en comparación con la proporción CAR+ CD4+/CD8+ en una célula T CAR+ diseñada. **FIG. 3B** muestra una gráfica de análisis de ajuste bivariado de la proporción de células T CD27+/CCR7+/CD4+ a células T CD27+/CCR7+/CD8+ en una mezcla inicial de células CD4 y CD8 seleccionadas en comparación con la proporción CAR+ CD4+/CD8+ en una composición diseñada CAR+ células T. **FIG. 3C** muestra una gráfica de análisis de ajuste bivariado de la proporción de células T CD62L-/CCR7+/CD4+ a células T CD62L/CCR7+/CD8+ en una mezcla inicial de células CD4 y CD8 seleccionadas en comparación con la proporción CAR+ CD4+/CD8+ en una composición diseñada de CAR+ células T. Las líneas curvas representan los límites de la elipse normal bivariada en $p=0,950$.

Descripción detallada

[0061] Las formas de realización de la invención se describen en algunos de los casos y aspectos descritos a continuación.

[0062] En el presente documento se describen métodos para preparar una composición de células, por ejemplo una composición de células de entrada, para su uso en células de ingeniería genética para expresar un receptor recombinante. En algunos casos, los métodos incluyen uno o más pasos para producir una composición de células de entrada que contiene una proporción definida, controlada o deseada de células T CD4+ de tipo ingenuo a células T CD8+ de tipo ingenuo. En algunos casos, la composición de entrada divulgada se puede producir mezclando o combinando una composición de células que contiene células T CD4+ que tienen un número o porcentaje conocido o determinado de células T CD4+ de tipo ingenuo con una composición de células que contiene células T CD8+ que tienen un número conocido o determinado o porcentaje de células T CD8+ de tipo ingenuo, para lograr la proporción elegida o deseada. También se describen métodos para estimular, expandir y/o inducir la proliferación de células en la composición de entrada. Los métodos divulgados también pueden incluir métodos asociados con la ingeniería genética de células, tales como métodos de transducción, incluidos métodos para introducir un receptor recombinante, por ejemplo, un receptor de antígeno quimérico, en dichas células para su uso en relación con la terapia celular adoptiva.

[0063] En un caso, el procesamiento de la composición de entrada generada incluye incubar las células en condiciones de agitación, por ejemplo en algunos aspectos, para activar las células para ingeniería o transducción o para expansión celular. Los métodos, en algunos casos, incluyen etapas para diseñar una pluralidad de tipos de células, tales como células CD4+ y células CD8+, tales como las aisladas y presentes en la composición de entrada. En algunos aspectos, la ingeniería se lleva a cabo para introducir un receptor de antígeno diseñado genéticamente en las células, tal como un TCR, por ejemplo, un TCR de alta afinidad, o un receptor de antígeno funcional no TCR, tal como un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunos aspectos, los métodos incluyen procesamiento adicional, tal como incubación adicional, por ejemplo a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ o aproximadamente, y/o formulación de células y composiciones que contienen la misma. En algunos casos, el procesamiento produce una composición de salida resultante que contiene células modificadas genéticamente, tales como células CD4+ y células CD8+ modificadas genéticamente, incluidas células en las que las células CD4+ y CD8+ modificadas genéticamente están presentes en una proporción deseada. En algunos casos, la composición de salida procesada resultante se puede usar en métodos para administrar células y composiciones preparadas mediante los métodos a un paciente, por ejemplo, en relación con la terapia celular adoptiva.

[0064] En algunos aspectos, es ventajosa una composición de salida que contiene células modificadas, por ejemplo, células T CAR+, en las que las células CD4+ y CD8+ modificadas están presentes en una proporción deseada, o

dentro de un cierto grado de error tolerado de la proporción deseada. Por ejemplo, la ingeniería de células enriquecidas para una pluralidad de poblaciones o tipos de células diferentes, tales como poblaciones y subpoblaciones de células T CD4+ y CD8+ aisladas, puede mejorar la eficacia o reducir o evitar efectos no deseados. En algunos casos, dichas proporciones incluyen aquellas que se consideran óptimas para el uso terapéutico, por ejemplo, proporciones de producción que se consideran apropiadas u óptimas para la administración a un paciente en relación con la terapia celular adoptiva. En algunos casos, la proporción deseada de células T CD4+ a CD8+ en una composición de salida para administración a un sujeto, tal como en conexión con terapia celular adoptiva, es de aproximadamente 2:1 a 0,5:1, por ejemplo en o aproximadamente 1:1. En algunos aspectos, una composición que contiene células T CD8+ y CD4+ aisladas, tal como que contiene una cierta proporción deseada de tales células, aumenta la capacidad de las células finalmente administradas a un sujeto para persistir, expandirse, activarse y/o injertarse in vivo o tras la administración a un sujeto. En algunos aspectos, mejora o aumenta una o más funciones efectoras o fenotipos de activación. Por ejemplo, tales ventajas se pueden lograr en algunos aspectos administrando una población CD4+ y una población CD8+ en comparación con una población CD8+ sola.

[0065] En algunos casos, los métodos proporcionan una o más ventajas en comparación con otros métodos de preparación, aislamiento, incubación e ingeniería, tales como ahorro de costos, tiempo y/o recursos. Tales ventajas pueden incluir la capacidad de aislar, procesar, por ejemplo, incubar y/o diseñar la pluralidad de poblaciones celulares, presentes en o cerca de una proporción deseada, con mayor eficiencia y/o menor complejidad, tiempo, costo y/o uso de recursos, en comparación con otros métodos.

[0066] En algunos casos, los métodos divulgados se basan en observaciones de que, en ciertos procesos de producción celular para células de ingeniería, la proporción de entrada de células CD4+ a CD8+, o una proporción de células viables de las mismas, puede no correlacionarse con la proporción de salida de células diseñadas CD4+ a CD8+, o una proporción de células viables de las mismas. Como se muestra en este documento, se encuentra que la relación deseada de las células T CD4+ a CD8+ de ingeniería (por ejemplo, células T CAR+ CD4 a CAR+ CD8+ o de la relación de células viables de las mismas) en una composición de salida está correlacionada o asociada con la relación de células T ingenuas CD4+ de tipo ingenuo a células T CD8+ de tipo ingenuo, o una proporción de células viables de las mismas, presentes en una composición de entrada antes de llevar a cabo un proceso de producción en las células para producir la composición de salida, que implica, por ejemplo, una o más etapas de estimulación, activación, expansión, proliferación y/o transducción de las células. Son ejemplos de tales células de tipo ingenuo las proporciones de células CD4+ a CD8+ que son CD45RA+ y CCR7+, CD62L-/CCR7+ o CD27+/CCR7+. En algunos aspectos, se observa que dicha correlación entre la proporción de células CD4/CD8 de tipo ingenuo en una composición de entrada y células CD4+ a CD8+ modificadas genéticamente (por ejemplo, células T CAR+ CD4 a CAR+ CD8+ o la proporción de células viables de las mismas) en una composición de salida existe incluso a pesar de las variaciones en el proceso utilizado para generar o producir las composiciones resultantes. Las fuentes de esta variación pueden incluir una serie de factores diferentes, incluidos pasos o condiciones particulares del proceso que podrían introducir variabilidad de una composición de células a otra, o pueden provenir de diferencias en los individuos o muestras a partir de las cuales se asilan, seleccionan, derivan u obtienen las células.

[0067] En ciertos casos, los métodos divulgados se basan en observaciones de que la proporción deseada de células T CD4+ a CD8+ diseñadas (por ejemplo, células T CAR+ CD4 a CAR+ CD8+ o la proporción de células viables de las mismas) en una composición de salida está correlacionada o asociada con la proporción de las células T CD45RA+/CCR7+CD4+ a las células T CD45RA+/CCR7+CD8+, o una proporción de células viables de las mismas, presentes en una composición de entrada antes de llevar a cabo un proceso de producción en las células para producir la composición de salida, por ejemplo, que implica una o más etapas de estimulación, activación, expansión, proliferación y/o transducción de las células. En ciertos aspectos, se observa que dicha correlación entre la proporción de células CD45RA+/CCR7+CD4+ a CD45RA+/CCR7+CD8+ en una composición de entrada y células CD4+ a CD8+ diseñadas (por ejemplo, células T CAR+ CD4 a CAR+ CD8+ o la proporción de células T viables células de los mismos) en una composición de salida existe incluso a pesar de las variaciones en el donante y/o proceso usado para generar o producir las composiciones de salida.

[0068] En casos particulares, los métodos divulgados se basan en observaciones de que la proporción deseada de células T CD4+ a CD8+ diseñadas (por ejemplo, células T CAR+ CD4 a CAR+ CD8+ o la proporción de células viables de las mismas) en una composición de salida está correlacionada o asociada con la proporción de las células T CD62L-/CCR7+CD4+ a las células T CD62L-/CCR7+CD8+, o una proporción de células viables de las mismas, presentes en una composición de entrada antes de llevar a cabo un proceso de producción en las células para producir la composición de salida, por ejemplo que implica uno o más pasos de estimulación, activación, expansión, proliferación y/o transducción de las células. En ciertos aspectos, se observa que dicha correlación entre la proporción de células CD62L-/CCR 7+CD4+ a CD62L-/CCR7+CD8+ en una composición de entrada a células CD4+ a CD8+ diseñadas (por ejemplo, células T CAR+ CD4 a CAR+ CD8+ o de la proporción de células viables de las mismas) en una composición de salida existe incluso a pesar de las variaciones en el donante y/o proceso utilizado para generar o producir las composiciones de salida.

[0069] En algunos casos, los métodos divulgados se basan en observaciones de que la proporción deseada de células T CD4+ a CD8+ diseñadas (por ejemplo, células T CAR+ CD4 a CAR+ CD8+ o la proporción de células viables de las mismas) en una composición de salida está correlacionada o asociada con la proporción de las células T

CD27+/CCR7+CD4+ a las células T CD27+/CCR7+CD8+, o una proporción de células viables de las mismas, presentes en una composición de entrada antes de llevar a cabo un proceso de producción en las células para producir la composición de salida, por ejemplo, que implica una o más etapas de estimulación, activación, expansión, proliferación y/o transducción de las células. En ciertos aspectos, se observa que dicha correlación entre la proporción de células CD27+/CCR7+CD4+ a CD27+/CCR7+CD8+ en una composición de entrada y células CD4+ a CD8+ diseñadas (por ejemplo, células T CAR+ CD4 a CAR+ CD8+ o la proporción de células T viables células de los mismos) en una composición de salida existe incluso a pesar de las variaciones en el donante y/o proceso usado para generar o producir las composiciones de salida.

[0070] En algunos aspectos, los métodos divulgados garantizan que una composición de salida de células genéticamente modificadas, por ejemplo células T CAR+, generadas por un proceso de producción celular logre una proporción deseada relativamente consistente y/o controlada de las células T CD4+ a CD8+ modificadas, o una proporción de células viables de los mismos, que exhibe una variación de dicha relación que es baja o está por debajo de una variación aceptable o umbral, entre las composiciones producidas por el proceso, incluidas aquellas derivadas de muestras de varios sujetos diferentes, tales como aquellas que tienen características diferentes, tales como como sujetos de diferentes edades, número y/o tipos de terapias previas, e indicación y subtipo o severidad o grado de las mismas. En algunos aspectos, tales procesos generan una proporción de dichas células CD4+ a CD8+ diseñadas (por ejemplo, células T CAR+ CD4 a CAR+ CD8+ o la proporción de células viables de las mismas) que varía en no más del 20 % o no más del 10 % o no más del 5 % de un promedio de dicha proporción en una pluralidad de composiciones de células T producidas por el proceso y/o varía de dicho promedio en no más de una desviación estándar o varía en no más del 20 % o no más del 10 % o no más del 5 % entre una pluralidad de composiciones de células T producidas por el proceso entre tales diversas muestras y pacientes.

[0071] En algunos casos, el uso de un proceso que produce una mayor consistencia entre la composición de salida generada entre un proceso de producción celular, tal como con respecto a la proporción de células T CD4 a CD8 diseñadas, puede ser ventajoso para asegurar la consistencia en la dosificación de un sujeto. que, en algunos aspectos, puede optimizar la eficacia, potencia y/o seguridad de la composición administrada entre los sujetos tratados. En algunos aspectos, la ingeniería de células enriquecidas para poblaciones de células T CD4+ y CD8+ con una proporción de producción deseada en la composición de producción diseñada puede mejorar la eficacia o reducir o evitar efectos no deseados. En algunos aspectos, el aislamiento o enriquecimiento aumenta la capacidad de las células finalmente administradas a un sujeto para persistir, expandirse, activarse y/o injertarse in vivo o tras la administración a un sujeto. En algunos aspectos, mejora o aumenta una o más funciones efectoras o fenotipos de activación. Dichos resultados se pueden lograr incluso cuando existe variabilidad de donantes entre las muestras de células iniciales para el desarrollo celular.

[0072] En algunos casos, los métodos descritos en el presente documento permiten la producción de composiciones celulares terapéuticas de células diseñadas que tienen una proporción de producción deseada en la composición de salida sin requerir que las células T CD4+ y CD8+ diseñadas se procesen y/o administren por separado. Por tanto, los métodos descritos proporcionan métodos más simplificados y/o controlados para preparar una composición que tiene al menos una relación de producción deseada de población de células T CD4+ y población de células T CD8+ modificadas genéticamente. En aspectos particulares, después de producir una composición de entrada que contiene la proporción deseada de células CD4 y CD8 de tipo ingenuo a las naturales como se describe, los métodos divulgados se pueden usar en un proceso de producción celular en el que las células T CD4+ y CD8+ se procesan, por ejemplo, se activan, se estimulan, expandidos y/o transducidos, juntos en un proceso de flujo único. Por lo tanto, en algunos aspectos, los métodos permiten la introducción de un receptor de antígeno modificado genéticamente para su uso en terapia celular adoptiva, donde las poblaciones celulares se aíslan, incuban y/o modifican en combinación, y el método se asocia con una mayor eficiencia y/o o complejidad, tiempo, costo y/o uso de recursos reducidos en comparación con un método en el que las poblaciones se aíslan, incuban y/o diseñan por separado.

[0073] También se describen células y composiciones preparadas mediante los métodos, incluidas composiciones y formulaciones farmacéuticas, y kits, sistemas y dispositivos para llevar a cabo los métodos. También se describen métodos para el uso de las células y composiciones preparadas mediante los métodos, incluidos métodos terapéuticos, tales como métodos para terapia celular adoptiva, y composiciones farmacéuticas para administración a sujetos.

[0074] Los títulos de las secciones utilizados en este documento tienen únicamente fines organizativos y no deben interpretarse como limitativos del tema descrito.

I. MÉTODOS PARA GENERAR CÉLULAS DISEÑADAS CON UNA PROPORCIÓN CONTROLADA DE CÉLULAS T CD4+ A CD8+ O SUBTIPOS PARTICULARES DE LAS MISMAS

[0075] En el presente documento se describen métodos para generar una composición de células, por ejemplo una composición de células de entrada, para su uso en células de ingeniería genética para expresar un receptor recombinante. En algunos casos, la composición de células de entrada contiene células T CD4+ y células T CD8+. En ciertos casos, la célula de entrada compone uno o más subtipos o poblaciones de células T CD4+ y/o CD8+. En ciertos casos, uno o más subtipos o poblaciones son células ingenuas y/o similares. En casos particulares, la composición de

células de entrada contiene células T CD4+, y al menos una parte de las células T CD4+ son células CD4 de tipo ingenuo. En algunos casos, la composición de células de entrada contiene células T CD8+, y al menos una parte de las células T CD8+ son células de tipo ingenuo. En casos particulares, la composición de células de entrada contiene y/o tiene una proporción fija, preferida, diana, definida y/o controlada de células T CD4+ de tipo ingenuo a células T CD8+ de tipo ingenuo.

[0076] En ciertos casos, los métodos incluyen una o más etapas de mezclar o combinar células o composiciones de células para generar o producir una composición de células de entrada. En ciertos casos, las células o composiciones celulares se han seleccionado y/o aislado de una muestra. En algunos casos, las células de la composición de células de entrada se han seleccionado y/o aislado de una muestra. En algunos casos, las células T CD4+ y/o una composición de células T CD4+ se seleccionan o aíslan de una muestra. En algunos casos, la muestra es una muestra biológica, tal como una muestra de sangre, una muestra de aféresis y/o una muestra de leucoféresis. En ciertos casos, la muestra es de un sujeto, por ejemplo un sujeto humano. En casos particulares, la composición de células T CD4+ y la composición de células T CD8+ se aíslan y/o seleccionan de la misma muestra. En ciertos casos, la composición de células T CD4+ y la composición de células T CD8+ se aíslan y/o seleccionan a partir de muestras tomadas u obtenidas del mismo sujeto.

[0077] En algunos casos, la generación o producción de una composición de células de entrada incluye una o más etapas de evaluación, caracterización y/o identificación de células. En casos particulares, las células se evalúan, caracterizan y/o identifican en una composición de células T CD4+. En algunos casos, las células se evalúan, caracterizan y/o identifican en una composición de células T CD8+. En algunos casos, las células se evalúan en busca de células que sean positivas para un marcador que indique y/o esté asociado con un estado similar al natural en las células T. En ciertos casos, las células se evalúan en busca de células que sean negativas para un marcador que indica y/o está asociado con un estado no natural en las células T. En casos particulares, las células de composiciones de células T CD4+ y CD8+, tales como composiciones celulares aisladas de una muestra biológica de un sujeto, se evalúan, caracterizan y/o identifican para determinar la cantidad, nivel, porcentaje y/o porcentaje de células que son positivas para uno o más marcadores asociados con un estado de tipo no ingenuo y/o son negativas para uno o más marcadores asociados con un estado de tipo no de tipo ingenuo. En ciertos casos, las células de composiciones de células T CD4+ y CD8+, tales como composiciones celulares aisladas de una muestra biológica de un sujeto, se evalúan, caracterizan y/o identifican para determinar la cantidad, nivel, porcentaje y/o porcentaje de células que son células de tipo ingenuo.

[0078] En algunos casos, los métodos incluyen una o más etapas de mezclar o combinar una composición de células que contiene células T CD4+ con una composición de células que contiene células T CD8+ para generar o producir una composición de células, por ejemplo, una composición de células de entrada, con una proporción definida de células T CD4+ de tipo ingenuo a células T CD8+ de tipo ingenuo. En algunos casos, la generación o producción de la composición de células de entrada incluye una o más etapas de: (i) aislar o seleccionar una composición de células T CD4+ y/o una composición de células T CD8+ de una muestra, por ejemplo, una muestra biológica; (ii) evaluar, caracterizar y/o identificar la cantidad, nivel, parte y/o porcentaje de células que son positivas para uno o más marcadores asociados con un estado similar a ingenuo y/o son negativas para uno o más marcadores asociados con un estado no similar a ingenuo en la composición de células T CD4+ y/o CD8+; y/o (iii) mezclar o combinar células de una composición de células T CD4+ con células de una composición de células T CD8+ en una proporción definida, fija y/o preferida de células T CD4+ de tipo ingenuo a células T CD8+ de tipo ingenuo. En casos particulares, la proporción de células T CD4+ de tipo ingenuo con respecto a células T CD8+ de tipo ingenuo en la composición de células de entrada es diferente de la proporción que está presente en la muestra.

[0079] En casos particulares, el contenido, la composición y/o la constitución de la composición de células de entrada se correlaciona, controla, corresponde y/o se asocia con el contenido, la composición y/o la constitución de la composición de células de salida. En ciertos casos, la cantidad, porcentaje, número, número por volumen, número por peso y/o proporción de células de tipo ingenuo y/o similares, por ejemplo, células T de tipo ingenuo, en una composición de células de entrada se correlaciona, controla, corresponde y/o se asocia con el contenido, composición y/o constitución de la composición de células de salida. En casos particulares, la cantidad, parte, número, número por volumen, número por peso y/o proporción de células T CD4+ de tipo ingenuo y/o células T CD8+ de tipo ingenuo en una composición de células de entrada se correlaciona, controla, corresponde, y/o asociados con el contenido, composición y/o constitución de la composición de células de salida.

[0080] En algunos casos, los métodos incluyen uno o más pasos de ingeniería genética de las células de la composición de entrada. En algunos casos, la ingeniería genética incluye una o más etapas de incubar las células de la composición de células de entrada en condiciones que activan y/o simulan las células, suministrando un gen, por ejemplo, un gen recombinante y/o heterólogo a las células, expandiendo las células incubando las células en condiciones de activación o estimulación, recogiendo las células y/o almacenando las células mediante congelación, por ejemplo, criopreservación. En algunos casos, uno o más pasos de la ingeniería genética producen una composición de células de salida que contiene células diseñadas. En ciertos casos, las células diseñadas de la composición de salida tienen una proporción fija, definida y/o objetivo de células CD4+ a CD8+.

[0081] En algunos casos, los métodos descritos en el presente documento incluyen uno o más pasos para generar células diseñadas, tales como células que expresan un receptor recombinante, que tienen una proporción definida de células T CD4+ a CD8+. En ciertos casos, los métodos descritos en el presente documento incluyen uno o más pasos para modificar genéticamente células a partir de una composición de células inicial y/o de entrada para generar una composición de células resultante y/o de salida que tiene una proporción definida de células T CD4+ a CD8+ genéticamente modificadas. En casos particulares, la ingeniería genética es o incluye transfección o transducción de células de la composición de células de entrada para introducir un agente que contiene un ácido nucleico en las células de la composición de células de entrada. En algunos casos, el ácido nucleico codifica un receptor recombinante, por ejemplo, un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunos casos, generar una composición de células de salida incluye uno o más pasos de activar o estimular células de la composición de células de entrada; modificar genéticamente, transducir o transfectar las células a partir de la composición de células de entrada; y/o expandir las células transfectadas; dando como resultado de este modo una composición de células de salida que tiene una proporción definida de células T CD4+ a CD8+ genéticamente modificadas, tal como una proporción de 1:1.

A. Células y preparación de composiciones de células de entrada

[0082] En algunos casos, los métodos divulgados en el presente documento incluyen uno o más pasos para preparar células para ingeniería genética. En ciertos casos, uno o más pasos incluyen aislar células de una muestra biológica para preparar una composición de células para ser modificadas genéticamente, por ejemplo, una composición de células de entrada. En algunos casos, la preparación de una composición de células de entrada incluye una o más etapas de aislar dos o más tipos celulares y/o composiciones de un tipo o subtipo celular particular, y mezclar o combinar los tipos celulares y/o las composiciones celulares de los tipos de células particulares en una única composición de células de entrada. En casos particulares, las composiciones celulares de los tipos celulares particulares se evalúan para determinar la presencia, cantidad y/o proporciones de subtipos adicionales en las composiciones. En ciertos casos, las composiciones celulares de los tipos celulares particulares se mezclan o combinan para lograr composiciones celulares de entrada en proporciones fijas o determinadas de tipos o subtipos celulares. En algunos casos, los tipos de células y/o subtipos de células se correlacionan, controlan, corresponden y/o se asocian con el contenido, composición y/o constitución de la composición de células de salida.

[0083] En ciertos casos, la preparación de una composición de células de entrada incluye una o más etapas de aislar composiciones de o que incluyen células T CD4+, aislar composiciones de o que incluyen células T CD8+, y mezclar o combinar las composiciones de células T CD4+ y CD8+ de la célula particular. tipos en una única composición de célula de entrada. En ciertos casos, la preparación de la composición de células de entrada incluye una o más etapas de evaluación, determinación y/o cuantificación de la parte o cantidad de un subtipo de células T CD4+ y/o CD8+ de las composiciones celulares. En casos particulares, el subtipo de células T CD4+ y/o CD8+ son o incluyen células T CD4+ y/o CD8+ ingenuas y/o similares. En algunos casos, las partes o cantidades de células de tipo virgen en la composición de células de entrada se correlacionan, controlan, corresponden y/o se asocian con el contenido, composición y/o constitución de la composición de células de salida.

[0084] En algunos casos, las células, por ejemplo, las células T CD4+ y/o CD8+, que se aíslan de una muestra son células eucariotas, tales como células de mamíferos, y en algunos casos son células humanas. En algunos casos, las células se derivan de la sangre, la médula ósea, la linfa o los órganos linfoides de un sujeto y/o son células del sistema inmunológico, tales como células de la inmunidad innata o adaptativa. En algunos casos, las células son linfocitos. En determinados casos, los linfocitos son linfocitos T o células T. En algunos casos, las células incluyen células T CD4+ y células T CD8+.

[0085] En ciertos casos, las composiciones de células T, por ejemplo, composiciones de células T CD4+ y/o composiciones de células T CD8+, contienen subtipos de células que se clasifican además por función, estado de activación, madurez, potencial de diferenciación, expansión, marcador o perfil de secreción de citoquinas y/o grado de diferenciación. Por ejemplo, en algunos casos, las células son o incluyen células T CD4+ y/o CD8+ de tipo ingenuo y/o similares. Con referencia al sujeto a tratar, las células pueden ser alogénicas y/o autólogas. Entre los métodos se incluyen métodos disponibles en el mercado. En algunos casos, los métodos incluyen aislar células del sujeto, preparar, procesar, cultivar y/o diseñar las células y reintroducir las células en el mismo sujeto, antes o después de la criopreservación.

[0086] En algunos casos, la preparación de las células diseñadas incluye uno o más pasos de cultivo y/o preparación. Las células para usar en una composición de células de entrada, por ejemplo, una composición de células que se van a modificar genéticamente, por ejemplo, para expresar un receptor recombinante tal como el CAR, pueden contener células que se han aislado de una muestra, tal como una muestra biológica, ejem., uno obtenido o derivado de un sujeto. En algunos casos, el sujeto del que se aísla la célula es uno que tiene la enfermedad o afección o necesita una terapia celular o a la que se le administrará la terapia celular. En algunos casos, el sujeto es un ser humano que necesita una intervención terapéutica particular, como la terapia celular adoptiva para la cual se aíslan, procesan y/o diseñan células.

[0087] En algunos aspectos, la muestra, por ejemplo, una muestra biológica, de la que se derivan o aíslan las células es sangre o una muestra derivada de sangre, o se deriva de un producto de aféresis o leucoféresis. Las muestras

ejemplares incluyen sangre completa, células mononucleares de sangre periférica (PBMC), leucocitos, médula ósea, timo y/o células derivadas de los mismos. En algunos casos, las células se derivan, aíslan y/o seleccionan a partir de muestras o muestras biológicas que pueden incluir una muestra de sangre completa, una muestra de capa leucocítica, una muestra de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), una muestra de células T no fraccionadas, un linfocito. muestra, una muestra de glóbulos blancos, un producto de aféresis o un producto de leucoféresis. Las muestras incluyen, en el contexto de la terapia celular, por ejemplo, terapia celular adoptiva, muestras de fuentes autólogas y alogénicas.

[0088] En algunos casos, las células derivan de líneas celulares, por ejemplo, líneas de células T. En algunos casos, las células se obtienen de una fuente xenogénica, por ejemplo, de ratón, rata, primate no humano y cerdo.

[0089] En algunos casos, el aislamiento de las células o las composiciones de células, por ejemplo, linfocitos T o composiciones de células T CD4+ y/o composiciones de células T CD8+, incluye una o más etapas de preparación y/o separación celular sin afinidad. En algunos ejemplos, las células se lavan, centrifugan y/o incuban en presencia de uno o más reactivos, por ejemplo, para eliminar componentes no deseados, enriquecer los componentes deseados, lisar o eliminar células sensibles a reactivos particulares. En algunos ejemplos, las células se separan basándose en una o más propiedades, tales como densidad, propiedades adherentes, tamaño, sensibilidad y/o resistencia a componentes particulares.

[0090] En algunos ejemplos, las células de la sangre circulante de un sujeto se obtienen, por ejemplo, mediante aféresis o leucoféresis. Las muestras, en algunos aspectos, contienen linfocitos, incluyendo células T, monocitos, granulocitos, células B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y/o plaquetas, y en algunos aspectos contienen células distintas de los glóbulos rojos y las plaquetas.

[0091] En algunos casos, las células sanguíneas extraídas del sujeto se lavan, por ejemplo, para eliminar la fracción de plasma y colocar las células en un tampón o medio apropiado para etapas de procesamiento posteriores. En algunos casos, las células se lavan con solución salina tamponada con fosfato (PBS). En algunos casos, la solución de lavado carece de calcio y/o magnesio y/o muchos o todos los cationes divalentes. En algunos aspectos, una etapa de lavado se realiza en una centrífuga de "flujo continuo" semiautomática (por ejemplo, el procesador celular Cobe 2991, Baxter) según las instrucciones del fabricante. En algunos aspectos, una etapa de lavado se logra mediante filtración de flujo tangencial (TFF) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En algunos casos, las células se resuspenden en una variedad de tampones biocompatibles después del lavado, tales como, por ejemplo, PBS libre de $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$. En ciertos casos, se eliminan los componentes de una muestra de células sanguíneas y las células se resuspenden directamente en medios de cultivo.

[0092] En algunos casos, los métodos incluyen métodos de separación celular basados en la densidad, tales como la preparación de glóbulos blancos a partir de sangre periférica mediante la lisis de los glóbulos rojos y la centrifugación a través de un gradiente de Percoll o Ficoll.

[0093] En algunos casos, los métodos de aislamiento incluyen la separación de diferentes tipos de células basándose en la expresión o presencia en la célula de una o más moléculas específicas, tales como marcadores de superficie, por ejemplo, proteínas de superficie, marcadores intracelulares o ácido nucleico. En algunos casos, se puede utilizar cualquier método conocido de separación basado en dichos marcadores. En algunos casos, la separación es una separación basada en afinidad o inmun afinidad. Por ejemplo, el aislamiento en algunos aspectos incluye la separación de células y poblaciones de células basándose en la expresión de las células o el nivel de expresión de uno o más marcadores, típicamente marcadores de la superficie celular, por ejemplo, mediante incubación con un anticuerpo o compañero de unión que se une específicamente a dichos marcadores, seguidos generalmente de etapas de lavado y separación de las células que se han unido al anticuerpo o al compañero de unión, de aquellas células que no se han unido al anticuerpo o al compañero de unión.

[0094] Tales etapas de separación pueden basarse en una selección positiva, en la que las células que se han unido a los reactivos se retienen para su uso posterior, y/o en una selección negativa, en la que se retienen las células que no se han unido al anticuerpo o al compañero de unión. En algunos ejemplos, ambas fracciones se conservan para su uso posterior. En algunos aspectos, la selección negativa puede ser particularmente útil cuando no hay anticuerpo disponible que identifique específicamente un tipo de célula en una población heterogénea, de modo que la separación se lleva a cabo mejor basándose en marcadores expresados por células distintas a la población deseada.

[0095] No es necesario que la separación dé como resultado un enriquecimiento o eliminación del 100 % de una población celular particular o de células que expresan un marcador particular. Por ejemplo, la selección positiva o el enriquecimiento de células de un tipo particular, tales como aquellas que expresan un marcador, se refiere a aumentar el número o porcentaje de tales células, pero no necesariamente resulta en una ausencia completa de células que no expresan el marcador. Asimismo, la selección negativa, la eliminación o el agotamiento de células de un tipo particular, como las que expresan un marcador, se refiere a la disminución del número o porcentaje de dichas células, pero no tiene por qué dar como resultado una eliminación completa de todas esas células.

[0096] En algunos ejemplos, se llevan a cabo múltiples rondas de etapas de separación, donde la fracción seleccionada positiva o negativamente de una etapa se somete a otra etapa de separación, tal como una selección positiva o negativa posterior. En algunos ejemplos, un único paso de separación puede agotar las células que expresan múltiples marcadores simultáneamente, por ejemplo incubando células con una pluralidad de anticuerpos o compañeros de unión, cada uno específico para un marcador objetivo de la selección negativa. Asimismo, se pueden seleccionar positivamente múltiples tipos de células simultáneamente incubando células con una pluralidad de anticuerpos o compañeros de unión expresados en los diversos tipos de células.

[0097] Por ejemplo, en algunos aspectos, se aíslan subpoblaciones o subtipos específicos de células T, tales como células T CD4+ y/o células T CD8+, mediante técnicas de selección positiva o negativa. En ciertos casos, las células T CD4+ y/o una composición de células de o que incluye células T CD4+ se aíslan mediante técnicas de selección positiva o negativa. En casos particulares, las células T CD8+ y/o una composición de células de o que incluye células T CD8+ se aíslan mediante técnicas de selección positiva o negativa. En casos particulares, se aísla una composición de células T CD4+ y/o una composición de células T CD8+ mediante técnicas de selección positiva o negativa.

[0098] En algunos casos, el aislamiento se lleva a cabo mediante enriquecimiento de una población celular particular mediante selección positiva, o agotamiento de una población celular particular mediante selección negativa. En algunos casos, la selección positiva o negativa se logra incubando células con uno o más anticuerpos u otro agente de unión que se une específicamente a uno o más marcadores de superficie expresados (marcador⁺ o marcador⁺) o expresados en un nivel relativamente más alto (marcador^{alto}) en las células seleccionadas positiva o negativamente, respectivamente.

[0099] En algunos casos, las células T se separan de una muestra de PBMC mediante selección negativa de marcadores expresados en células no T, como células B, monocitos u otros glóbulos blancos, como CD14. En algunos aspectos, se utiliza una etapa de selección CD4+ o CD8+ para separar las células T citotóxicas CD4+ y CD8+. Dichas composiciones de CD4+ y CD8+ pueden contener células que pueden clasificarse o clasificarse adicionalmente en subpoblaciones basándose en la expresión positiva o negativa de marcadores y/o el nivel relativo de expresión de los marcadores. Dichos subtipos pueden incluir subtipos o subpoblaciones ingenuos, similares a ingenuos y/o no ingenuos.

[0100] En ciertos casos, las células T CD4+, por ejemplo, células T auxiliares CD4+, se clasifican en células de tipo ingenuo y/o similares, y no de tipo ingenuo y/o similares mediante la identificación de poblaciones celulares que tienen antígenos de superficie celular. En casos particulares, las células T CD8+, por ejemplo, células T auxiliares CD8+, se clasifican en células de tipo ingenuo y/o similares, y no de tipo ingenuo y/o similares, identificando poblaciones celulares que tienen antígenos de superficie celular.

[0101] En ciertos casos, los linfocitos T se separan o aíslan usando técnicas de separación inmunomagnética (o magnética de afinidad). En casos particulares, las células T CD4+ y/o las composiciones de células T CD4+ se separan o aíslan usando técnicas de separación inmunomagnética. En algunos casos, las células T CD8+ y/o las composiciones de células T CD8+ se separan o aíslan usando técnicas de separación inmunomagnética. La separación y el aislamiento utilizando técnicas de separación inmunomagnética (o magnética de afinidad) se revisan en *Methods in Molecular Medicine*, vol. 58: *Metastasis Research Protocols*, vol. 2: *Cell Behavior In Vitro and In Vivo*, páginas 17-25 Editado por: S. A Brooks y U. Schumacher © Humana Press Inc, Totowa, Nueva Jersey.

[0102] En algunos aspectos, la muestra o composición de células que se van a separar se incuban con material pequeño, magnetizable o magnéticamente sensible, tal como partículas o micropartículas magnéticamente sensibles, tales como perlas paramagnéticas (por ejemplo, como Dynalbeads o perlas MACS). El material magnéticamente sensible, por ejemplo, una partícula, generalmente está unido directa o indirectamente a un compañero de unión, por ejemplo, un anticuerpo, que se une específicamente a una molécula, por ejemplo, un marcador de superficie, presente en la célula, células o población de células que se desea separar, por ejemplo, que se desea seleccionar negativa o positivamente.

[0103] En algunos casos, la partícula o perla magnética comprende un material magnéticamente sensible unido a un miembro de unión específico, tal como un anticuerpo u otro compañero de unión. Hay muchos materiales magnéticamente sensibles bien conocidos que se utilizan en métodos de separación magnética. Las partículas magnéticas adecuadas incluyen las descritas en Molday, patente de EE. UU. 4.452.773, y en la memoria de patente europea EP 452342 B. Partículas de tamaño coloidal, tales como las descritas en Owen, patente de EE. UU. 4.795.698, y Liberti et al, patente de EE. UU. 5.200.084 son otros ejemplos.

[0104] La incubación generalmente se lleva a cabo en condiciones en las que los anticuerpos o compañeros de unión, o moléculas, tales como anticuerpos secundarios u otros reactivos, que se unen específicamente a dichos anticuerpos o compañeros de unión, que están unidos a la partícula o perla magnética, se unen específicamente a la célula. Moléculas de superficie si están presentes en las células dentro de la muestra.

[0105] En algunos aspectos, la muestra se coloca en un campo magnético, y aquellas células que tienen partículas magnéticamente sensibles o magnetizables unidas a ellas serán atraídas por el imán y separadas de las células no

marcadas. Para la selección positiva, se retienen las células que son atraídas por el imán; para la selección negativa, se retienen las células que no se sienten atraídas (células no marcadas). En algunos aspectos, se realiza una combinación de selección positiva y negativa durante el mismo paso de selección, donde las fracciones positivas y negativas se retienen y se procesan adicionalmente o se someten a pasos de separación adicionales.

[0106] En ciertos casos, las partículas magnéticamente sensibles están recubiertas con anticuerpos primarios u otros compañeros de unión, anticuerpos secundarios, lectinas, enzimas o estreptavidina. En ciertos casos, las partículas magnéticas se unen a las células mediante un recubrimiento de anticuerpos primarios específicos para uno o más marcadores. En ciertos casos, las células, en lugar de las perlas, se marcan con un anticuerpo primario o un compañero de unión, y luego se añaden partículas magnéticas recubiertas con un anticuerpo secundario específico del tipo celular u otro compañero de unión (por ejemplo, estreptavidina). En determinados casos, se utilizan partículas magnéticas recubiertas de estreptavidina junto con anticuerpos primarios o secundarios biotinilados.

[0107] En algunos casos, las partículas magnéticamente sensibles se dejan adheridas a las células que se van a incubar, cultivar y/o diseñar posteriormente; en algunos aspectos, las partículas se dejan adheridas a las células para su administración a un paciente. En algunos casos, las partículas magnetizables o magnéticamente sensibles se eliminan de las células. Se conocen métodos para eliminar partículas magnetizables de las células e incluyen, por ejemplo, el uso de anticuerpos no marcados competitivos y partículas magnetizables o anticuerpos conjugados con conectores escindibles. En algunos casos, las partículas magnetizables son biodegradables.

[0108] En algunos casos, la selección basada en afinidad se realiza mediante clasificación de células activadas magnéticamente (MACS) (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Los sistemas de clasificación de células activadas magnéticamente (MACS) son capaces de realizar una selección de alta pureza de células que tienen partículas magnetizadas unidas a ellas. En ciertos casos, MACS funciona en un modo en el que las especies objetivo y no objetivo se eluyen secuencialmente después de la aplicación del campo magnético externo. Es decir, las células adheridas a las partículas magnetizadas se mantienen en su lugar mientras las especies no adheridas se eluyen. A continuación, una vez completado este primer paso de elución, las especies que quedaron atrapadas en el campo magnético y a las que se les impidió ser eluidas se liberan de alguna manera de manera que puedan ser eluidas y recuperadas. En ciertos casos, las células no objetivo se marcan y se agotan de la población heterogénea de células.

[0109] En ciertos casos, el aislamiento o separación se lleva a cabo usando un sistema, dispositivo o aparato que lleva a cabo uno o más de los pasos de aislamiento, preparación celular, separación, procesamiento, incubación, cultivo y/o formulación de los métodos. En algunos aspectos, el sistema se utiliza para llevar a cabo cada uno de estos pasos en un entorno cerrado o estéril, por ejemplo, para minimizar errores, manipulación por parte del usuario y/o contaminación. En un ejemplo, el sistema es un sistema como se describe en la solicitud de patente internacional, número de publicación WO2009/072003 o US 20110003380 A1.

[0110] En algunos casos, el sistema o aparato lleva a cabo uno o más, por ejemplo, todos, los pasos de aislamiento, procesamiento, ingeniería y formulación en un sistema integrado o autónomo, y/o de forma automatizada o programable. En algunos aspectos, el sistema o aparato incluye una computadora y/o programa de computadora en comunicación con el sistema o aparato, que permite a un usuario programar, controlar, evaluar el resultado y/o ajustar diversos aspectos del procesamiento, aislamiento, pasos de ingeniería y formulación.

[0111] En algunos aspectos, la separación y/u otros pasos se llevan a cabo utilizando el sistema CliniMACS (Miltenyi Biotec), por ejemplo, para la separación automatizada de células a nivel de escala clínica en un sistema cerrado y estéril. Los componentes pueden incluir una microcomputadora integrada, una unidad de separación magnética, una bomba peristáltica y varias válvulas de manguito. La computadora integrada en algunos aspectos controla todos los componentes del instrumento y dirige el sistema para que realice procedimientos repetidos en una secuencia estandarizada. La unidad de separación magnética en algunos aspectos incluye un imán permanente móvil y un soporte para la columna de selección. La bomba peristáltica controla el caudal a lo largo del conjunto de tubos y, junto con las válvulas de pellizco, garantiza el flujo controlado de tampón a través del sistema y de manera continua. suspensión de células.

[0112] El sistema CliniMACS en algunos aspectos utiliza partículas magnetizables acopladas a anticuerpos que se suministran en una solución estéril y apirógena. En algunos casos, después de marcar las células con partículas magnéticas, las células se lavan para eliminar el exceso de partículas. A continuación, se conecta una bolsa de preparación de células al conjunto de tubos, que a su vez se conecta a una bolsa que contiene tampón y una bolsa de recogida de células. El juego de tubos consta de tubos estériles premontados, que incluyen una precolumna y una columna de separación, y son para un solo uso. Después del inicio del programa de separación, el sistema aplica automáticamente la muestra celular en la columna de separación. Las células marcadas se retienen dentro de la columna, mientras que las células no marcadas se eliminan mediante una serie de pasos de lavado. En algunos casos, las poblaciones de células que se utilizarán con los métodos descritos en el presente documento no están etiquetadas y no se retienen en la columna. En algunos casos, las poblaciones de células para su uso con los métodos descritos en el presente documento están etiquetadas y se retienen en la columna. En algunos casos, las poblaciones de células para su uso con los métodos descritos en el presente documento se eluyen de la columna después de la eliminación del campo magnético y se recogen dentro de la bolsa de recogida de células.

[0113] En ciertos casos, la separación y/u otros pasos se llevan a cabo utilizando el sistema CliniMACS Prodigy (Miltenyi Biotec). El sistema CliniMACS Prodigy en algunos aspectos está equipado con una unidad de procesamiento celular que permite el lavado y fraccionamiento automatizado de las células mediante centrifugación. El sistema CliniMACS Prodigy también puede incluir una cámara integrada y un software de reconocimiento de imágenes que determina el punto final óptimo de fraccionamiento celular al discernir las capas macroscópicas del producto celular de origen. Por ejemplo, la sangre periférica se separa automáticamente en eritrocitos, glóbulos blancos y capas de plasma. El sistema CliniMACS Prodigy también puede incluir una cámara de cultivo celular integrada que cumple protocolos de cultivo celular como, por ejemplo, diferenciación y expansión celular, carga de antígeno y cultivo celular a largo plazo. Los puertos de entrada pueden permitir la extracción estéril y la reposición de medios y las células se pueden monitorear utilizando un microscopio integrado. Véase, por ejemplo, Klebanoff et al. (2012) J Immunother. 35(9): 651-660, Terakura et al. (2012) Blood. 1:72-82, y Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701.

[0114] En algunos casos, una población celular descrita en el presente documento se recoge y se enriquece (o se agota) mediante citometría de flujo, en la que las células teñidas para múltiples marcadores de superficie celular se transportan en una corriente fluida. En algunos casos, una población celular descrita en el presente documento se recolecta y se enriquece (o se agota) mediante clasificación a escala preparativa (FACS). En ciertos casos, una población celular descrita en el presente documento se recoge y se enriquece (o se agota) mediante el uso de chips de sistemas microelectromecánicos (MEMS) en combinación con un sistema de detección basado en FACS (véase, por ejemplo, el documento WO 2010/033140, Cho et al. (2010) Lab Chip 10, 1567-1573 y Godin et al. (2008) J Biophoton. 1(5):355-376. En ambos casos, las células se pueden marcar con múltiples marcadores, lo que permite el aislamiento de subconjuntos de células T de alta pureza bien definidas.

[0115] En algunos casos, los anticuerpos o compañeros de unión se marcan con uno o más marcadores detectables, para facilitar la separación para la selección positiva y/o negativa. Por ejemplo, la separación puede basarse en la unión a anticuerpos marcados con fluorescencia. En algunos ejemplos, la separación de células basada en la unión de anticuerpos u otros compañeros de unión específicos para uno o más marcadores de superficie celular se realiza en una corriente fluida, tal como mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), incluida la escala preparativa (FACS) y/o chips de sistemas microelectromecánicos (MEMS), por ejemplo, en combinación con un sistema de detección de citometría de flujo. Dichos métodos permiten la selección positiva y negativa basada en múltiples marcadores simultáneamente.

Composiciones de células de entrada

[0116] En ciertos casos, en el presente documento se describen métodos para producir y/o preparar una composición de células de entrada. En ciertos casos, la composición de células de entrada es una composición de células para uso en ingeniería genética, por ejemplo, células que serán modificadas genéticamente con un ácido nucleico que codifica una proteína recombinante, tal como un receptor recombinante, por ejemplo CAR y/o que se someterán a un proceso para producir células genéticamente modificadas que expresan una proteína recombinante, tal como un receptor recombinante, por ejemplo un CAR. En ciertos casos, las células de la composición de entrada se tratarán, se pondrán en contacto y/o se incubarán con un ácido nucleico que codifica un receptor recombinante. En ciertos casos, la composición de células de entrada contiene células T CD4⁺ y células T CD8⁺. En casos particulares, la composición de células de entrada contiene células T CD4⁺ y células T CD8⁺ que incluyen una proporción particular deseada, fija y/o controlada de células T CD4⁺ a CD8⁺ que son células T de tipo ingenuo y/o similares.

[0117] En algunos casos, la proporción deseada, fija y/o controlada de células T CD4⁺ a CD8⁺ que son células T de tipo ingenuo y/o de tipo ingenuo es la proporción o número de células en las que se incluyen dos tipos de células o poblaciones de células aisladas en una composición de células de entrada, diseñada para dar como resultado una composición de células de salida con una proporción deseada, definida y/o controlada de células T CD4⁺ a CD8⁺ diseñadas, o dentro de una tasa de error tolerada o diferencia de la misma, al finalizar la incubación y/o paso de ingeniería u otros pasos de procesamiento y/o al descongelarse y/o justo antes de la administración a un sujeto.

[0118] En ciertos casos, la composición de células de entrada contiene una proporción, por ejemplo, una proporción definida, controlada y/o fija, de células T CD4⁺ de tipo ingenuo a células T CD8⁺ de tipo ingenuo. En casos particulares, la proporción de células T CD4⁺ de tipo ingenuo a células T CD8⁺ de tipo ingenuo está entre 10:1 y 0,05:1, entre 8:1 y 0,1:1, entre 5:1 y 0,2:1, entre 2,5:1 a 0,25:1, entre 2,2:1 a 0,8:1, entre 2:1 a 0,5:1 o entre 1,5:1 a 1:1, inclusive. En casos particulares, la proporción de células T CD4⁺ de tipo ingenuo a células T CD8⁺ de tipo ingenuo está entre 2:1 y 0,8:1, entre 1,6:1 y 0,8:1, entre 1,4:1 y 0,8:1, entre 1,2:1 a 0,8:1, o entre 1,2:1 a 0,8:1, inclusive. En algunos casos, la relación está entre 2,2:1 y 0,8:1, inclusive. En ciertos casos, la proporción de células T CD4⁺ de tipo ingenuo a células T CD8⁺ de tipo ingenuo es o es aproximadamente 2,2:1, 2,1:1, 2,0:1, 1,9:1, 1,8:1, 1,7:1, 1,6:1, 1,5:1, 1,4:1, 1,3:1, 1,2:1, 1,1:1, 1,0:1, 0,9:1, o 0,8:1. En ciertos casos, la relación es o es aproximadamente 1,1:1.

[0119] En casos particulares, la composición de células de entrada tiene una cantidad de o aproximadamente 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $3,5 \times 10^8$, $4,0 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, 5×10^8 , 5×10^8 , o 1×10^9 células totales o células totales viables. En ciertos

- casos, la composición de células de entrada tiene una cantidad de o aproximadamente 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $3,5 \times 10^8$, $4,0 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, 5×10^8 , 5×10^8 o 1×10^9 células que expresan CD4 o CD8. En algunos casos, la composición de células de entrada tiene una cantidad de o aproximadamente 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $3,5 \times 10^8$, $4,0 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, 5×10^8 , 5×10^8 o 1×10^9 células T CD4+ de tipo ingenuo y CD8+ de tipo ingenuo.
- 5
- 10 **[0120]** En casos particulares, la composición de células de entrada tiene entre 1×10^6 y 1×10^{10} , entre 1×10^7 y 1×10^9 , entre 5×10^7 y 5×10^8 , o entre 1×10^8 y 3×10^8 células totales o células totales viables. En ciertos casos, la composición de la célula de entrada tiene una cantidad de o aproximadamente entre 1×10^6 y 1×10^{10} , entre 1×10^7 y 1×10^9 , entre 5×10^7 y 5×10^8 , o entre 1×10^8 y 3×10^8 células que expresan CD4 o CD8. En algunos casos, la composición de la célula de entrada tiene una cantidad de o aproximadamente entre 1×10^6 y 1×10^{10} , entre 1×10^7 y 1×10^9 , entre 5×10^7 y 5×10^8 , o entre 1×10^8 y 3×10^8 células T CD4+ de tipo ingenuo y CD8+ de tipo ingenuo.
- 15
- 20 **[0121]** En algunos casos, la composición de células de entrada tiene o contiene al menos 1 %, al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,9 %, o 100 % o aproximadamente 100 % de células de tipo ingenuo. En casos particulares, la composición de la célula de entrada contiene o incluye no más del 100 %, no más del 99 %, no más del 98 %, no más del 97 %, no más del 96 %, no más del 95 %, no más del 90 %, o no más del 85 % de células de tipo ingenuo.
- 25
- 30 **[0122]** En casos particulares, los métodos divulgados en el presente documento incluyen uno o más pasos para producir, generar y/o elaborar una composición de células de entrada. En ciertos casos, producir, generar y/o preparar una composición de células de entrada incluye una o más etapas de mezclar o combinar células de una composición de células T CD4+ con células de una composición de células T CD8+.
- 35
- 40 **[0123]** En algunos casos, las células, por ejemplo, las células T CD4+, las células T CD8+, de la composición de entrada se han aislado y/o seleccionado a partir de una muestra, por ejemplo, una muestra biológica. En ciertos casos, la fuente de las células de la composición de entrada son composiciones de células, por ejemplo, composiciones de células T CD4+ y composiciones de células T CD8+, que han sido aisladas y/o seleccionadas de la muestra, tales como aisladas o seleccionadas por separado. En casos particulares, la composición de células T CD4+ y la composición de células T CD8+ se aíslan y/o seleccionan, tal como se aíslan y/o seleccionan por separado, de una muestra, por ejemplo, una muestra biológica. En ciertos casos, la composición de células T CD4+ y la composición de células T CD8+ se aíslan y/o seleccionan de la misma muestra. En ciertos casos, la composición de células T CD4+ y la composición de células T CD8+ se aíslan y/o seleccionan a partir de muestras tomadas u obtenidas del mismo sujeto.
- 45
- 50 **[0124]** En casos particulares, la composición de células T CD4+ contiene o incluye al menos 60 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,9 % o 100 % o aproximadamente 100 % de células T CD4+. En algunos casos, la composición de células T CD4+ contiene o incluye no más del 100 %, no más del 99 %, no más del 98 %, no más del 97 %, no más del 96 %, no más del 95 %, no más del 90 % o no más del 85 % de células T CD4+.
- 55
- 60 **[0125]** En ciertos casos, la composición de células T CD8+ contiene o incluye al menos 60 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,9 % o 100 % o aproximadamente 100 % de células T CD8+. En casos particulares, la composición de células T CD8+ contiene o incluye no más del 100 %, no más del 99 %, no más del 98 %, no más del 97 %, no más del 96 %, no más del 95 %, no más del 90 % o no más del 85 % de células T CD8+.
- 65
- [0126]** En ciertos casos, producir, generar y/o elaborar una composición de células de entrada incluye una o más etapas de medir, determinar y/o cuantificar la cantidad, parte, número, número por volumen, número por peso y/o porcentaje de células T CD4+ viables y/o células T CD8+ viables que están presentes en la composición de células T CD4+ y/o la composición de células T CD8+, por ejemplo, antes de combinar o mezclar las células de las composiciones celulares. En casos particulares, producir, generar y/o elaborar una composición de células de entrada incluye una o más etapas de medir, determinar y/o cuantificar la cantidad, parte, número, número por volumen, número por peso y/o porcentaje de células T CD4+ de tipo ingenuo y/o células T CD8+ de tipo ingenuo que están presentes en la composición de células T CD4+ y/o la composición de células T CD8+. En algunos casos, las células T CD4+ de tipo ingenuo y/o CD8+ de tipo ingenuo son células de tipo ingenuo viables.
- [0127]** En ciertos casos, producir, generar y/o elaborar una composición de células de entrada incluye una o más etapas de medir, determinar y/o cuantificar la cantidad, parte, número, número por volumen, número por peso y/o porcentaje de células T CD4+ viables y/o células T CD8+ viables que están presentes en la muestra, por ejemplo, la muestra biológica. En casos particulares, producir, generar y/o elaborar una composición de células de entrada incluye

una o más etapas de medir, determinar y/o cuantificar la cantidad, parte, número, número por volumen, número por peso y/o porcentaje de células T CD4+ de tipo ingenuo y/o células T CD8+ de tipo ingenuo que están presentes en la muestra. En algunos casos, las células T CD4+ de tipo ingenuo y/o CD8+ de tipo ingenuo son células de tipo ingenuo viables.

[0128] En algunos casos, las células de la composición de entrada se aíslan y/o seleccionan de una muestra, por ejemplo, una muestra biológica. En casos particulares, las partes de células de tipo ingenuo en la muestra, por ejemplo, la parte de células T CD4+ y CD8+ de tipo ingenuo se conocen o han sido determinadas, medidas o evaluadas. En algunos casos, las células de la muestra se aíslan y/o seleccionan para producir directamente una composición de células, por ejemplo, una composición de células de entrada, con una proporción definida, fija o controlada de células T CD4+ de tipo ingenuo a células T CD8+ de tipo ingenuo. En ciertos casos, las células se aíslan y/o seleccionan con selección de perlas por inmunoafinidad. En algunos casos, las células se aíslan y/o seleccionan con columnas de afinidad. En casos particulares, las células de la muestra se aíslan o seleccionan de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en el documento WO 2015/164675 para producir una composición de células con una proporción definida, controlada y/o fija de células CD4+ de tipo ingenuo a células CD8+ de tipo ingenuo.

[0129] En ciertos casos, la composición de células de entrada contiene células que fueron aisladas y/o seleccionadas directamente de una muestra mediante un primer y un segundo aislamiento o selección. En ciertos casos, la composición de entrada se produce realizando una primera y una segunda selección para aislar una cantidad, número o concentración de células T CD4+ y células T CD8+ suficiente para producir la proporción definida, fija y/o controlada de células CD4+ de tipo ingenuo a células T CD8+ de tipo ingenuo.

[0130] En algunos casos, las células de la muestra se aíslan, seleccionan y/o enriquecen directamente para producir una composición de células de entrada enriquecida en células CD4+ y células CD8+. En algunos casos, la cantidad, el número, el porcentaje, el número por volumen y/o el número por peso de células CD4+ de tipo ingenuo y CD8+ de tipo ingenuo se han medido, evaluado y/o determinado en la muestra, y las células CD4+ y CD8+ se aíslan, seleccionan y/o se enriquecen en cantidades suficientes para lograr una composición de células de entrada con la proporción definida, fija o controlada de células T CD4+ de tipo ingenuo a CD8+ de tipo ingenuo. En algunos casos, las células que se aíslan, seleccionan y/o enriquecen directamente de la muestra son la composición de células de entrada y se usan en pasos de procesamiento posteriores, tales como pasos de procesamiento posteriores que implican incubación, agitación, activación, ingeniería y/o formulación de las células enriquecidas.

[0131] En algunos casos, las células aisladas, seleccionadas y/o enriquecidas de la muestra, tales como una composición de células de entrada, contienen una proporción de células CD4+ a células CD8+ en una proporción definida, fija o controlada de células CD4+ de tipo ingenuo a células CD8+ de tipo ingenuo. En los casos de los métodos descritos en el presente documento, la primera y/o segunda selección, o selecciones para subpoblaciones de las mismas, de la muestra se pueden realizar de manera que dé como resultado una composición de células de entrada con una proporción deseada de células T CD4+ de tipo ingenuo a células CD8+ de tipo ingenuo.

[0132] En algunos casos, antes de realizar la primera y/o segunda selección de la muestra, se determina la proporción de células T CD4+ a CD8+ en la muestra, por ejemplo, la muestra biológica. En ciertos casos, antes de realizar la primera y/o segunda selección, se determina la proporción de células T CD4+ de tipo ingenuo y CD8+ de tipo ingenuo en la muestra. En función de la proporción particular de células T CD4+ a CD8+ y/o células T CD4+ a CD8+ de tipo ingenuo en la muestra, que puede variar entre muestras, el modo particular de selección se puede individualizar para la muestra, por ejemplo, mediante el tamaño de columnas de cromatografía o selección de cantidad o concentración de reactivos de inmunoafinidad, para lograr la relación deseada, fija o controlada. El nivel relativo o la frecuencia de diversas poblaciones celulares en un sujeto se puede determinar basándose en la evaluación de la expresión superficial de un marcador o marcadores presentes en dichas poblaciones o subpoblaciones. Se pueden usar varios métodos bien conocidos para evaluar el nivel de expresión de proteínas o marcadores de superficie, tales como la detección mediante métodos basados en afinidad, por ejemplo, métodos basados en inmunoafinidad, por ejemplo, en el contexto de proteínas de la superficie celular, tales como mediante citometría de flujo.

[0133] En algunos contextos, la proporción apropiada para células T CD4+ y CD8+ de tipo ingenuo puede variar dependiendo del contexto, por ejemplo, para una enfermedad, afección o tratamiento previo particular de un sujeto del que se derivan las células, y/o una especificidad antigénica particular de las células, representación relativa entre células de un tipo particular (por ejemplo, células CD4+) de diversas subpoblaciones, por ejemplo, células efectoras versus células de memoria versus células de tipo ingenuo, y/o una o más condiciones bajo las cuales se incubarán las células, tales como medio, agentes estimulantes, tiempo de cultivo, tampones, contenido de oxígeno, contenido de dióxido de carbono, antígeno, citoquinas, anticuerpos y otros componentes. Por lo tanto, puede ser que un tipo de célula que típicamente o en general se sabe que prolifera o se expande más rápidamente que otro no siempre tenga esa propiedad en todos los contextos. Por lo tanto, en algunos aspectos, la proporción de células T CD4+ de tipo ingenuo y células T CD8+ de tipo ingenuo se determina basándose en las capacidades conocidas de los tipos de células en un contexto normal o típico, junto con la evaluación de los fenotipos o estados de las células o del sujeto de donde se derivan las células, y/o evidencia empírica.

[0134] En algunos casos, la separación y/o los pasos se llevan a cabo utilizando perlas inmunomagnéticas. En algunos casos, una muestra de células que contiene células CD4+ y CD8+ se pone en contacto con perlas magnéticas que contienen un primer reactivo de inmutofinidat que se une a CD4 o CD8 y perlas magnéticas que contienen un segundo reactivo de inmutofinidat que se une a otras de CD4 o CD8. La separación y/o las etapas pueden ocurrir simultáneamente y/o secuencialmente.

[0135] En algunos casos, el primer y/o segundo reactivo de inmutofinidat están presentes en la composición de incubación en una concentración de rendimiento subóptima, por lo que la composición enriquecida contiene menos de la totalidad, por ejemplo, el 70 %, del total de células CD4+ en la composición de incubación y/o o menos de todas, por ejemplo, el 70 %, de las células CD8+ en la composición de incubación, produciendo de este modo una composición enriquecida en células T CD4+ y CD8+.

[0136] En algunos casos, la concentración de rendimiento subóptima del reactivo de afinidad es una concentración por debajo de una concentración utilizada o requerida para lograr un rendimiento óptimo o máximo de células unidas en una selección o enriquecimiento dado que implica incubar células con el reactivo y recuperar o separar células que se han unido. al reactivo ("rendimiento", por ejemplo, siendo el número de células así recuperadas o seleccionadas en comparación con el número total de células en la incubación que son objetivo del reactivo o para las cuales el reactivo es específico o que tienen un marcador para cual el reactivo es específico y capaz de unirse). La concentración de rendimiento subóptima generalmente es una concentración o cantidad del reactivo que en tal proceso o paso logra menos que todo, por ejemplo, no más del 70 % de rendimiento de células unidas, por ejemplo, células T CD4+ y/o CD8+, tras la recuperación de las células unidas al reactivo. En algunos casos, no se logra más de o aproximadamente 50 %, 45 %, 40 %, 30 % o 25 % de rendimiento mediante la concentración subóptima del reactivo de afinidad. La concentración se puede expresar en términos de número o masa de partículas o superficies por célula y/o número de masa o moléculas de agente (por ejemplo, anticuerpo, tal como fragmento de anticuerpo) por célula. En casos particulares, las concentraciones de rendimiento subóptimas son suficientes para derivar o lograr la proporción fija, controlada y/o definida de células T CD4+ de tipo ingenuo a células T CD8+ de tipo ingenuo.

[0137] En algunos casos, por ejemplo, cuando se opera en una concentración de rendimiento subóptima para cada o uno o más de dos o más reactivos de selección con afinidad por las células T CD4+ y/o CD8+, uno o más de dichos reactivos se usan en una concentración que es mayor que uno o más de dichos reactivos, con el fin de sesgar la proporción del tipo de célula reconocida por ese reactivo en comparación con el tipo de célula reconocido por el otro. Por ejemplo, el reactivo que se une específicamente al marcador para el cual se desea sesgar la relación puede incluirse en una concentración (por ejemplo, agente o masa por células) que se incrementa a la mitad, 1 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces o más, en comparación con otros, dependiendo de cuánto se desee aumentar la proporción.

[0138] En algunos casos, cuando se opera en el rango subóptimo y/o con suficientes células para lograr la saturación de los reactivos, la cantidad de reactivo de inmutofinidat es proporcional al rendimiento aproximado de células enriquecidas. En ciertos casos, se puede determinar de forma rutinaria una cantidad o concentración apropiada de reactivos de inmutofinidat que dependen de la proporción deseada de la composición generada que contiene las células T CD4+ y CD8+ enriquecidas o seleccionadas.

[0139] En algunos casos, las etapas de separación y/o aislamiento se llevan a cabo utilizando perlas magnéticas en las que los reactivos de inmutofinidat están unidos de manera reversible, como mediante la interacción de un ligando peptídico con una muteína de estreptavidina como se describe en el documento WO 2015/164675. Son ejemplos de tales perlas magnéticas los Streptamers®. En algunos casos, la separación y/o las etapas se llevan a cabo usando perlas magnéticas, tales como las disponibles comercialmente en Miltenyi Biotec.

[0140] En algunos casos, la primera selección o enriquecimiento de células CD4+ y CD8+ de una muestra se realiza usando reactivos basados en inmutofinidat que incluyen al menos una primera y una segunda matriz de cromatografía de afinidad, respectivamente, teniendo inmovilizado sobre la misma un anticuerpo. En algunos casos, una o ambas de la primera y/o segunda selección pueden emplear una pluralidad de matrices y/o anticuerpos de cromatografía de afinidad, por lo que la pluralidad de matrices y/o anticuerpos empleados para la misma selección, es decir, la primera selección o la segunda selección, están conectados en serie. En algunos casos, la matriz o matrices de cromatografía de afinidad empleadas en una primera y/o segunda selección adsorben o son capaces de seleccionar o enriquecer al menos aproximadamente 50×10^6 células/ml, 100×10^6 células/ml, 200×10^6 células/ml o 400×10^6 células/ml. En algunos casos, la capacidad de adsorción se puede modular en función del diámetro y/o longitud de la columna. En algunos casos, la proporción de inicio del cultivo de la composición seleccionada o enriquecida se logra eligiendo una cantidad suficiente de matriz y/o una cantidad relativa suficiente para lograr la proporción de inicio del cultivo suponiendo que se base en, por ejemplo, la capacidad de adsorción del columna o columnas para seleccionar células.

[0141] En un caso ejemplar, las células T CD4+ y las células T CD8+ tienen una proporción igual o similar de células de tipo ingenuo, y la capacidad de adsorción de la matriz o matrices es la misma entre la primera y la segunda selección, por ejemplo, es o es aproximadamente 1×10^8 células/ml para ambos, por lo que el enriquecimiento o la selección de células en la primera selección y la segunda selección da como resultado una composición que contiene

células CD4+ a células CD8+ con una proporción de células T CD4+ a CD8+ de tipo ingenuo de o aproximadamente 1:1. En casos particulares, se puede elegir o determinar un volumen, diámetro o número apropiado de columnas de cromatografía matricial de afinidad para la primera y/o segunda selección dependiendo de las partes de células de tipo ingenuo y de la proporción deseada de la composición de células de entrada generada como una cuestión de rutina.

[0142] En algunos casos, la capacidad de adsorción de una matriz o matrices de columna se ajusta para tener en cuenta las diferencias en la frecuencia de células de tipo ingenuo, por ejemplo, células CD4+ o CD8+ de tipo ingenuo, en comparación con la frecuencia de las células de la respectiva población padre CD4+ o CD8+ en la muestra inicial del sujeto. El nivel relativo o la frecuencia de diversas poblaciones celulares en un sujeto se puede determinar basándose en la evaluación de la expresión superficial de un marcador o marcadores presentes en dichas poblaciones o subpoblaciones. Se pueden usar varios métodos bien conocidos para evaluar el nivel de expresión de proteínas o marcadores de superficie, tales como la detección mediante métodos basados en afinidad, por ejemplo, métodos basados en inmunofluorescencia, por ejemplo, en el contexto de proteínas de la superficie celular, tales como mediante citometría de flujo.

[0143] En algunos casos, las células de tipo ingenuo, por ejemplo, células T CD4+ y/o CD8+ de tipo ingenuo, se evalúan, miden y/o detectan en composiciones celulares, por ejemplo, composiciones de células T CD4+ y/o CD8+, o en una muestra, por ejemplo, una muestra biológica. En algunos casos, una célula T de tipo ingenuo es una célula T que es positiva para la expresión de uno o más marcadores que indican que la célula es natural y/o es una célula de tipo ingenuo. En ciertos casos, una célula T de tipo ingenuo es una célula que es positiva para la expresión de un marcador que está asociado con un estado ingenuo o de tipo ingenuo en las células T. En casos particulares, una célula T de tipo ingenuo es una célula T que es negativa para la expresión de uno o más marcadores, lo que indica que la célula no es natural y/o no es una célula de tipo ingenuo. En ciertos casos, una célula T de tipo ingenuo es una célula que es negativa para la expresión de un marcador que está asociado con un estado no ingenuo o de tipo no ingenuo en las células T. En ciertos casos, un estado no ingenuo o de tipo no ingenuo en células T incluye, por ejemplo, pero sin limitación, células T efectoras (T_{EFF}), células T de memoria, células T de memoria central (T_{CM}), células T efectoras de memoria (T_{EM}), y combinaciones de las mismas.

[0144] En algunos casos, una célula T de tipo ingenuo es positiva para la expresión de al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más de diez marcadores que indican que la célula es ingenua y/o es una célula de tipo ingenuo, y/o está asociada con un estado natural o de tipo ingenuo en células T. En algunos casos, los marcadores se expresan en la superficie celular. En ciertos casos, la célula T de tipo ingenuo es negativa para la expresión de al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más de diez marcadores que indican que la célula no es ingenua y/o es una célula de tipo no ingenuo, y/o está asociada con un estado no ingenuo o de tipo no ingenuo en células T.

[0145] Los marcadores que indican que la célula T es ingenua y/o es una célula T de tipo ingenuo y/o están asociados con un estado ingenuo o de tipo ingenuo en las células T incluyen, entre otros, CD27, CD28, CD45RA, CD62L y/o CCR7. En algunos casos, la célula T de tipo ingenuo, por ejemplo, la célula T CD4+ y/o CD8+ de tipo ingenuo, es positiva para la expresión de CD27, CD28, CD45RA y/o CCR7. En ciertos casos, la célula T de tipo ingenuo es positiva para la expresión en superficie de uno o más de CD27, CD28, CD45RA y/o CCR7. En algunos casos, la célula T de tipo ingenuo, por ejemplo, la célula T CD4+ y/o CD8+ de tipo ingenuo, es negativa para la expresión de CD62L.

[0146] Los marcadores que indican que la célula es una célula T no nativa y/o es una célula T de tipo no ingenuo, y/o están asociados con un estado no nativa o de tipo no ingenuo en células T incluyen, pero no se limitan a, CD25, CD45RO, CD56, KLRG1 y/o CD95. En algunos casos, la célula T de tipo ingenuo, por ejemplo, una célula T CD4+ y/o CD8+ de tipo ingenuo, es negativa para la expresión de CD25, CD45RO, CD56 y/o KLRG1. En casos particulares, la célula T de tipo ingenuo, por ejemplo, una célula T CD4+ y/o CD8+ de tipo ingenuo, tiene una baja expresión de un marcador asociado con células no naturales o de tipo no natural. En casos particulares, la célula T de tipo ingenuo tiene una baja expresión de CD95. En ciertos casos, la célula T de tipo ingenuo es negativa para la expresión en superficie de uno o más de CD25, CD45RO, CD56 y/o KLRG1.

[0147] En algunos casos, la baja expresión de un marcador asociado con células no de tipo ingenuo o de tipo no de tipo ingenuo es o incluye al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % menos de expresión que la expresión del marcador en una célula que es una célula no nativa, y/o una célula que es positiva para uno o más marcadores que indican que la célula es una célula T no nativa y/o es una célula T de tipo no ingenuo, y/o está asociada con una célula no nativa o de tipo no ingenuo en las células T. En ciertos casos, la baja expresión de un marcador asociado con células no nativas o de tipo no ingenuo es o incluye al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % menos de expresión que la expresión del marcador en una célula T efectora (T_{EFF}), una célula T de memoria, una célula T de memoria central (T_{CM}) y/o una célula T de memoria efectora (T_{EM}).

[0148] En algunos casos, los marcadores que indican que la célula es una célula T no natural y/o es una célula T de tipo no natural, y/o están asociados con un estado no natural o de tipo no natural en células T incluyen, uno o más citocinas. Por ejemplo, en ciertos casos, las células T no nativas o de tipo no ingenuo son negativas para la expresión y/o la producción de uno o más de IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-10. En algunos casos, se secretan una o más citoquinas. En casos particulares, la una o más citocinas se expresan internamente por las células T no de tipo ingenuo, por ejemplo, durante o después del tratamiento con un agente que previene, inhibe o reduce la secreción.

[0149] En ciertos casos, una célula T de tipo ingenuo es positiva para la expresión, por ejemplo, expresión superficial, de CD45RA y CCR7. En casos particulares, una célula T CD4⁺ de tipo ingenuo es positiva para la expresión, por ejemplo, expresión superficial, de CD45RA y CCR7. En algunos casos, una célula T CD8⁺ similar a la natural es positiva para la expresión, por ejemplo, expresión superficial, de CD45RA y CCR7. En casos particulares, una célula T de tipo ingenuo es positiva para la expresión, por ejemplo, expresión superficial, de CD45RA, CD27 y CCR7 y es negativa para la expresión, por ejemplo, expresión superficial de CD45RO. En casos particulares, una célula T CD4⁺ de tipo ingenuo es positiva para la expresión, por ejemplo, expresión superficial, de CD45RA, CD27 y CCR7 y es negativa para la expresión, por ejemplo, expresión superficial de CD45RO. En algunos casos, una célula T CD8⁺ de tipo ingenuo es positiva para la expresión, por ejemplo, expresión superficial, de CD45RA, CD27 y CCR7 y es negativa para la expresión, por ejemplo, expresión superficial de CD45RO.

[0150] En ciertos casos, las células T CD4⁺ y/o CD8⁺ son células viables. En ciertos casos, las células T CD4⁺ y/o CD8⁺ son células viables de tipo ingenuo. La célula viable es positiva para la expresión de un marcador que indica que la célula sufre procesos celulares funcionales normales y/o no ha sufrido o no está en proceso de sufrir necrosis o muerte celular programada. En algunos casos, la viabilidad puede evaluarse mediante el potencial redox de la célula, la integridad de la membrana celular o la actividad o función de las mitocondrias. En algunos casos, la viabilidad es la ausencia de una molécula específica asociada con la muerte celular, o la ausencia de una indicación de muerte celular en un ensayo.

[0151] En ciertos casos, la viabilidad celular se evalúa con un ensayo que puede incluir, entre otros, ensayos de absorción de colorantes (p. ejem., ensayos de calceína AM), ensayos de viabilidad de células XTT y ensayos de exclusión de colorantes (p. ejem., azul tripán, eosina o ensayos de exclusión del tinte de propidio). En casos particulares, una célula viable tiene expresión negativa de uno o más marcadores apoptóticos, por ejemplo, anexina V o caspasa 3 activa. En algunos casos, la célula viable es negativa para la expresión o activación de uno o más marcadores de apoptosis que pueden incluir, pero no se limitan a, una caspasa, por ejemplo, caspasa 2, caspasa 3, caspasa 6, caspasa 7, caspasa 8, caspasa 9 y caspasa 10, miembros de la familia Bcl-2, por ejemplo, Bax, Bad y Bid, Anexina V y/o tinción TUNEL.

[0152] En algunos casos, la expresión es o incluye una cantidad, nivel, concentración y/o presencia del marcador. En casos particulares, el marcador es un polipéptido. En algunos casos, el marcador es un ARNm. En algunos casos, la expresión es o incluye una cantidad, nivel, concentración y/o presencia de un polipéptido, por ejemplo, el polipéptido marcador. En ciertos casos, una cantidad, nivel, concentración y/o presencia de un polinucleótido, por ejemplo, un ARNm o un ADNc derivado del ARNm, que codifica el marcador. En ciertos casos, la expresión es o incluye una cantidad, nivel, concentración y/o presencia del marcador sobre o expuesto en la superficie celular o dentro de la membrana celular. En ciertos casos, la expresión es o incluye una cantidad, nivel, concentración y/o presencia del marcador sobre o expuesto en la superficie celular o dentro de la membrana celular. En casos particulares, la expresión es o incluye expresión interna, por ejemplo, una cantidad, nivel, concentración y/o presencia del marcador dentro de la célula internamente, tal como dentro del citosol, núcleo, retículo endoplásmico y/o el aparato de Golgi.

[0153] En algunos casos, los marcadores se miden, evalúan y/o cuantifican realizando un ensayo in vitro. En algunos ejemplos, el ensayo in vitro es un inmunoensayo, un ensayo basado en aptámeros, un ensayo histológico o citológico, o un ensayo del nivel de expresión de ARNm. En algunos casos, el ensayo in vitro utilizado puede ser un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunotransferencia, inmunoprecipitación, radioinmunoensayo (RIA), inmunotinción, ensayo de citometría de flujo, resonancia plasmática de superficie (SPR), ensayo de quimioluminiscencia, inmunoensayo de flujo lateral, ensayo de inhibición o ensayo de avidin. En algunos casos, la expresión de los marcadores se mide, evalúa y/o cuantifica mediante RNA-seq. En casos particulares, la expresión de los marcadores se mide, evalúa y/o cuantifica mediante técnicas de inmunotinción. En casos particulares, la expresión de los marcadores se mide, evalúa y/o cuantifica mediante análisis de citometría de flujo. En algunos casos, la expresión de los marcadores se mide, evalúa y/o cuantifica mediante tinción interna con citoquinas.

[0154] En algunos casos, los marcadores se miden, evalúan y/o cuantifican en células de la composición de células T CD4⁺. En casos particulares, al menos el 1 %, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 95 %, al menos el 97 % o al menos el 99 % de las células T CD4⁺ son células T CD4⁺ de tipo ingenuo. En determinados casos, entre el 10 % y el 50 %, entre el 20 % y el 60 %, entre el 25 % y el 75 %, entre el 30 % y el 80 %, entre el 40 % y el 90 %, entre el 50 % y el 100 %, entre el 30 % y 50 %, entre 40 % y 60 %, entre 50 % y 70 %, entre el 60 % y 80 %, entre 70 % y 90 %, entre 80 % y 100 %, entre 5 % y 25 %, entre 25 % y 50 %, entre el 50 % y el 75 %, o entre el 75 % y el 99 % de las células

T CD4+ son células T CD4+ de tipo ingenuo. En ciertos casos, las células T CD4+ de tipo ingenuo son células T CD4+ de tipo ingenuo viables.

[0155] En ciertos casos, los marcadores se miden, evalúan y/o cuantifican en células de la composición de células T CD8+. En casos particulares, al menos el 1 %, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 95 %, al menos el 97 % o al menos el 99 % de las células T CD8+ son células T CD8+ de tipo ingenuo. En determinados casos, entre el 10 % y el 50 %, entre el 20 % y el 60 %, entre el 25 % y el 75 %, entre el 30 % y el 80 %, entre el 40 % y el 90 %, entre el 50 % y el 100 %, entre el 30 % y 50 %, entre 40 % y 60 %, entre 50 % y 70 %, entre 60 % y 80 %, entre 70 % y 90 %, entre 80 % y 100 %, entre 5 % y 25 %, entre 25 % y 50 %, entre el 50 % y el 75 %, o entre el 75 % y el 99 % de las células T CD8+ son células T CD4+ de tipo ingenuo. En ciertos casos, las células T CD8+ de tipo ingenuo son células T CD8+ de tipo ingenuo viables.

[0156] En algunos casos, las células de una composición de células T CD4+ se mezclan o combinan con células de una composición de células T CD8+ en cantidades y/o proporciones suficientes para producir una composición de células de entrada con una proporción de células T CD4+ de tipo ingenuo a células T CD8+ de tipo ingenuo entre 10:1 y 0,05:1, entre 8:1 y 0,1:1, entre 5:1 y 0,2:1, entre 2,5:1 y 0,25:1, entre 2,2:1 y 0,8:1, entre 2:1 y 0,5:1, o entre 1,5:1 y 1:1, inclusive. En algunos casos, las células se mezclan en cantidades y/o proporciones suficientes para una proporción de células T CD4+ de tipo ingenuo a células T CD8+ de tipo ingenuo de entre 2,2:1 y 0,8:1, inclusive. En ciertos casos, las células se mezclan o combinan en una proporción de células T CD4+ de tipo ingenuo con respecto a células T CD8+ de tipo ingenuo de o de aproximadamente 2,2:1, 2,1:1, 2,0:1, 1,9:1, 1,8:1, 1,7:1, 1,6:1, 1,5:1, 1,4:1, 1,3:1, 1,2:1, 1,1:1, 1,0:1, 0,9:1 u 0,8:1. En ciertos casos, las células se mezclan o combinan en una proporción de o aproximadamente 1,1:1.

[0157] En algunos casos, una cantidad de o aproximadamente 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $3,5 \times 10^8$, $4,0 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, 5×10^8 , 5×10^8 o 1×10^9 , las células T CD4+ totales o viables se mezclan o combinan con una cantidad de o aproximadamente 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $3,5 \times 10^8$, $4,0 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, 5×10^8 , $5,5 \times 10^8$, o 1×10^9 células T CD8+ totales o viables totales para producir una composición de células de entrada con una proporción definida de células T CD4+ de tipo ingenuo y células T CD8+ de tipo ingenuo. En ciertos casos, entre 1×10^6 y 1×10^{10} , entre 1×10^7 y 1×10^9 , entre 5×10^7 y 5×10^8 , o entre 1×10^8 y 3×10^8 células T CD4+ totales o viables se mezclan o combinan con una cantidad de o aproximadamente entre 1×10^8 y 1×10^{10} , entre 1×10^7 y 1×10^9 , entre 5×10^7 y 5×10^8 , o entre 1×10^8 y 3×10^8 células T CD8+ totales o viables totales para producir una composición de células de entrada con una proporción definida de células T CD4+ de tipo ingenuo a células T CD8+ de tipo ingenuo.

[0158] En algunos casos, una cantidad de o aproximadamente 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $3,5 \times 10^8$, $4,0 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, 5×10^8 , 5×10^8 o 1×10^9 células T CD4+ de tipo ingenuo se mezclan o combinan con una cantidad de o aproximadamente de 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $3,5 \times 10^8$, $4,0 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, 5×10^8 , $5,5 \times 10^8$ o 1×10^9 células T CD8+ de tipo ingenuo para producir una composición de células de entrada con una proporción definida de células T CD4+ de tipo ingenuo y células T CD8+ de tipo ingenuo. En determinados casos, entre 5×10^5 y 1×10^{10} , 1×10^6 y 1×10^{10} , entre 1×10^7 y 1×10^9 , entre 5×10^7 y 5×10^8 , o entre 1×10^8 y 3×10^8 células T CD4+ de tipo ingenuo se mezclan o combinan con una cantidad de o aproximadamente entre 5×10^5 y 1×10^{10} , 1×10^6 y 1×10^{10} , entre 1×10^7 y 1×10^9 , entre 5×10^7 y 5×10^8 , o entre 1×10^8 y 3×10^8 células T CD8+ de tipo ingenuo para producir una composición de células de entrada con una proporción definida de células T CD4+ de tipo ingenuo a células T CD8+ de tipo ingenuo.

[0159] En casos particulares, la proporción de células T CD4+ de tipo ingenuo con respecto a células T CD8+ de tipo ingenuo de la composición de células de entrada se ha ajustado, cambiado y/o alterado en comparación con la proporción de células T CD4+ de tipo ingenuo con respecto a células T CD4+ de tipo ingenuo como células T CD8+ de una muestra, por ejemplo, una muestra biológica. En casos particulares, la proporción de células T CD4+ de tipo ingenuo a células T CD8+ de tipo ingenuo es o es aproximadamente o es al menos 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 100 %, 1 vez, 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces ajustado, cambiado o alterado de la muestra biológica. En ciertos casos, la muestra es la muestra de donde se derivaron, aislaron, seleccionaron y/u obtuvieron células de la composición de células de entrada.

[0160] En ciertos casos, la composición de células de entrada contiene una proporción, por ejemplo, una proporción definida, controlada y/o fija, de células T CD45RA+/CCR7+/CD4+ a células T CD45RA+/CCR7+/CD8+. En casos

particulares, la proporción de células T CD45RA+/CCR7+/CD4+ a células T CD45RA+/CCR7+/CD8+ está entre 10:1 y 0,05:1, entre 8:1 y 0,1:1, entre 5:1 y 0,2:1, entre 2,5:1 y 0,25:1, entre 2,2:1 y 0,8:1, entre 2:1 y 0,5:1, o entre 1,5:1 y 1:1, inclusive. En casos particulares, la proporción de células T CD45RA+/CCR7+/CD4+ a células T CD45RA+/CCR7+/CD8+ está entre 2:1 y 0,8:1, entre 1,6:1 y 0,8:1, entre 1,4:1 y 0,8:1, entre 1,2:1 y 0,8:1, o entre 1,2:1 y 0,8:1, inclusive. En algunos casos, la relación está entre 2,2:1 y 0,8:1, inclusive. En ciertos casos, la proporción de células T CD45RA+/CCR7+/CD4+ a células T CD45RA+/CCR7+/CD8+ es o es aproximadamente 2,2:1, 2,1:1, 2,0:1, 1,9:1, 1,8:1, 1,7:1, 1,6:1, 1,5:1, 1,4:1, 1,3:1, 1,2:1, 1,1:1, 1,0:1, 0,9:1 o 0,8:1. En ciertos casos, la relación es o es aproximadamente 1,1:1.

[0161] En casos particulares, la composición de células de entrada tiene una cantidad de o aproximadamente 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $3,5 \times 10^8$, $4,0 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, 5×10^8 , 5×10^8 , o 1×10^9 células totales o células viables totales. En ciertos casos, la composición de células de entrada tiene una cantidad de o aproximadamente 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $3,5 \times 10^8$, $4,0 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, 5×10^8 , 5×10^8 o 1×10^9 células que expresan CD4 o CD8. En algunos casos, la composición de células de entrada tiene una cantidad de o aproximadamente 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $3,5 \times 10^8$, $4,0 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, 5×10^8 , 5×10^8 o 1×10^9 CD45RA+/CCR7+/CD4+ y células T CD45RA+/CCR7+/CD8+.

[0162] En casos particulares, la composición de células de entrada tiene entre 1×10^6 y 1×10^{10} , entre 1×10^7 y 1×10^9 , entre 5×10^7 y 5×10^8 , o entre 1×10^8 y 3×10^8 células totales o células totales viables. En ciertos casos, la composición de células de entrada tiene una cantidad de o aproximadamente entre 5×10^5 y 1×10^{10} , 1×10^6 y 1×10^{10} , entre 1×10^7 y 1×10^9 , entre 5×10^7 y 5×10^8 , o entre 1×10^8 y 3×10^8 células que expresan CD4 o CD8. En algunos casos, la composición de células de entrada tiene una cantidad de o aproximadamente entre 5×10^5 y 1×10^{10} , 1×10^6 y 1×10^{10} , entre 1×10^7 y 1×10^9 , entre 5×10^7 y 5×10^8 , o entre 1×10^8 y 3×10^8 células T CD45RA+/CCR7+/CD4+ y CD45RA+/CCR7+/CD8+.

[0163] En algunos casos, la composición de células de entrada tiene o contiene al menos 1 %, al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,9 %, o 100 % o aproximadamente 100 % de células CD45RA+/CCR7+. En casos particulares, la composición de la célula de entrada contiene o incluye no más del 100 %, no más del 99 %, no más del 98 %, no más del 97 %, no más del 96 %, no más del 95 %, no más de 90 %, o no más del 85 % de células CD45RA+/CCR7+.

[0164] En algunos casos, una cantidad de o aproximadamente 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $3,5 \times 10^8$, $4,0 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, 5×10^8 , 5×10^8 o 1×10^9 , se mezclan células T CD4+ totales o viables o combinadas con una cantidad de o aproximadamente 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $3,5 \times 10^8$, $4,0 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, 5×10^8 , $5,5 \times 10^8$ o 1×10^9 células T CD8+ totales o totales viables para producir una composición de células de entrada con una proporción definida de células T CD45RA+/CCR7+/CD4+ a células T CD45RA+/CCR7+/CD8+. En ciertos casos, entre 5×10^5 y 1×10^{10} , 1×10^6 y 1×10^{10} , entre 1×10^7 y 1×10^9 , entre 5×10^7 y 5×10^8 , o entre 1×10^8 y 3×10^8 en total o las células T CD4+ viables totales se mezclan o combinan con una cantidad de o aproximadamente entre 5×10^5 y 1×10^{10} , 1×10^6 y 1×10^{10} , entre 1×10^7 y 1×10^9 , entre 5×10^7 y 5×10^8 , o entre 1×10^8 y 3×10^8 células T CD8+ totales o viables totales para producir una composición de células de entrada con una proporción definida de células T CD45RA+/CCR7+/CD4+ a células T CD45RA+/CCR7+/CD8+.

[0165] En casos particulares, la proporción de células T CD45RA+/CCR7+/CD4+ a células T CD45RA+/CCR7+/CD8+ de la composición de células de entrada se ha ajustado, cambiado y/o alterado en comparación con la proporción de células T CD45RA+/CCR7+/CD4+ a células T CD45RA+/CCR7+/CD8+ de una muestra, por ejemplo, una muestra biológica. En casos particulares, la proporción de células T CD45RA+/CCR7+/CD4+ a células T CD45RA+/CCR7+/CD8+ es o es aproximadamente o es al menos 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 100 %, 1 vez, 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces ajustado, cambiado o alterado desde la muestra biológica. En ciertos casos, la muestra es la muestra de donde se derivaron, aislaron, seleccionaron y/u obtuvieron células de la composición de células de entrada.

[0166] En ciertos casos, la composición de células de entrada contiene una proporción, por ejemplo, una proporción definida, controlada y/o fija, de células T CD27+/CCR7+/CD4+ a células T CD27+/CCR7+/CD8+. En casos particulares, la proporción de células T CD27+/CCR7+/CD4+ a células T CD27+/CCR7+/CD8+ está entre 10:1 y

0,05:1, entre 8:1 y 0,1:1, entre 5:1 y 0,2:1, entre 2,5:1 y 0,25:1, entre 2,2:1 y 0,8:1, entre 2:1 y 0,5:1, o entre 2:1 y 1:1, inclusive. En casos particulares, la proporción de células T CD27+/CCR7+/CD4+ a células T CD27+/CCR7+/CD8+ está entre 2:1 y 0,8:1, entre 1,8:1 y 1:1, entre 1,8:1 y 1,2:1, entre 1,2:1 y 1,4:1, o entre 1,8:1 y 1,6:1, inclusive. En algunos casos, la relación está entre 1,8:1 y 1,6:1, inclusive. En ciertos casos, la proporción de células T CD27+/CCR7+/CD4+ a células T CD27+/CCR7+/CD8+ es o es aproximadamente 2,2:1, 2,1:1, 2,0:1, 1,9:1, 1,8:1, 1,7:1, 1,69:1, 1,6:1, 1,5:1, 1,4:1 o 1,3:1. En ciertos casos, la relación es o es aproximadamente 1,69:1.

[0167] En casos particulares, la composición de células de entrada tiene una cantidad de o aproximadamente 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $3,5 \times 10^8$, $4,0 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, 5×10^8 , 5×10^8 , o 1×10^9 células totales o células viables totales. En ciertos casos, la composición de células de entrada tiene una cantidad de o aproximadamente 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $3,5 \times 10^8$, $4,0 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, 5×10^8 , 5×10^8 o 1×10^9 células que expresan CD4 o CD8. En algunos casos, la composición de células de entrada tiene una cantidad de o aproximadamente 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $3,5 \times 10^8$, $4,0 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, 5×10^8 , 5×10^8 o 1×10^9 CD27+/CCR7+/CD4+ y células T CD27+/CCR7+/CD8+.

[0168] En casos particulares, la composición de células de entrada tiene entre 1×10^6 y 1×10^{10} , entre 1×10^7 y 1×10^9 , entre 5×10^7 y 5×10^8 , o entre 1×10^8 y 3×10^8 células totales o células viables. En ciertos casos, la composición de células de entrada tiene una cantidad de o aproximadamente entre 5×10^5 y 1×10^{10} , 1×10^6 y 1×10^{10} , entre 1×10^7 y 1×10^9 , entre 5×10^7 y 5×10^8 , o entre 1×10^8 y 3×10^8 células que expresan CD4 o CD8. En algunos casos, la composición de la célula de entrada tiene una cantidad de o aproximadamente entre 5×10^5 y 1×10^{10} , 1×10^6 y 1×10^{10} , entre 1×10^7 y 1×10^9 , entre 5×10^7 y 5×10^8 , o entre 1×10^8 y 3×10^8 células T CD27+/CCR7+/CD4+ y CD27+/CCR7+/CD8+.

[0169] En algunos casos, la composición de células de entrada tiene o contiene al menos 1 %, al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,9 %, o 100 % o aproximadamente 100 % de células CD27+/CCR7+. En casos particulares, la composición de la célula de entrada contiene o incluye no más del 100 %, no más del 99 %, no más del 98 %, no más del 97 %, no más del 96 %, no más del 95 %, no más de 90 %, o no más del 85 % de células CD27+/CCR7+.

[0170] En algunos casos, una cantidad de o aproximadamente 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $3,5 \times 10^8$, $4,0 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, 5×10^8 , 5×10^8 o 1×10^9 , células T CD4+ totales o viables totales se mezclan o combinan con una cantidad de o aproximadamente de 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $3,5 \times 10^8$, $4,0 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, 5×10^8 , $5,5 \times 10^8$ o 1×10^9 células T CD8+ totales o viables totales para producir una composición de células de entrada con una relación definida de células T CD27+/CCR7+/CD4+ a células T CD27+/CCR7+/CD8+. En ciertos casos, entre 5×10^5 y 1×10^{10} , 1×10^6 y 1×10^{10} , entre 1×10^7 y 1×10^9 , entre 5×10^7 y 5×10^8 , o entre 1×10^8 y 3×10^8 en total o las células T CD4+ viables totales se mezclan o combinan con una cantidad de o aproximadamente entre 5×10^5 y 1×10^{10} , 1×10^6 y 1×10^{10} , entre 1×10^7 y 1×10^9 , entre 5×10^7 y 5×10^8 , o entre 1×10^8 y 3×10^8 células T CD8+ totales o viables totales para producir una composición de células de entrada con una proporción definida de células T CD27+/CCR7+/CD4+ a células T CD27+/CCR7+/CD8+.

[0171] En casos particulares, la proporción de células T CD27+/CCR7+/CD4+ a células T CD27+/CCR7+/CD8+ de la composición de células de entrada se ha ajustado, cambiado y/o alterado en comparación con la proporción de células T CD27+/CCR7+/CD4+ a células T CD27+/CCR7+/CD8+ de una muestra, por ejemplo, una muestra biológica. En casos particulares, la proporción de células T CD27+/CCR7+/CD4+ a células T CD27+/CCR7+/CD8+ es o es aproximadamente o es al menos 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 100 %, 1 vez, 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces ajustado, cambiado o alterado de la muestra biológica. En ciertos casos, la muestra es la muestra de donde se derivaron, aislaron, seleccionaron y/u obtuvieron células de la composición de células de entrada.

[0172] En ciertos casos, la composición de células de entrada contiene una proporción, por ejemplo, una proporción definida, controlada y/o fija, de células T CD62L-/CCR7+/CD4+ a células T CD62L-/CCR7+/CD8+. En casos particulares, la proporción de células T CD62L-/CCR7+/CD4+ a células T CD62L-/CCR7+/CD8+ está entre 10:1 y 0,05:1, entre 8:1 y 0,1:1, entre 5:1 y 0,2:1, entre 2,5:1 y 0,25:1, entre 2,2:1 y 0,8:1, entre 2:1 y 0,5:1, o entre 1,5:1 y 1:1, inclusive. En casos particulares, la proporción de células T CD62L-/CCR7+/CD4+ a células T CD62L-/CCR7+/CD8+ está entre 2:1 y 0,8:1, entre 1,6:1 y 0,8:1, entre 1,4:1 y 0,8:1, entre 1,2:1 y 0,8:1, o entre 1,2:1 y 0,8:1,

inclusive. En algunos casos, la relación está entre 2,2:1 y 0,8:1, inclusive. En ciertos casos, la proporción de células T CD62L/CCR7+/CD4+ a células T CD62L-/CCR7+/CD8+ es o es aproximadamente 2,2:1, 2,1:1, 2,0:1, 1,9:1, 1,8:1, 1,7:1, 1,6:1, 1,5:1, 1,4:1, 1,3:1, 1,2:1, 1,1:1, 1,0:1, 0,9:1 o 0,8:1. En ciertos casos, la relación es o es aproximadamente 1,1:1.

[0173] En casos particulares, la composición de células de entrada tiene entre 1×10^6 y 1×10^{10} , entre 1×10^7 y 1×10^9 , entre 5×10^7 y 5×10^8 , o entre 1×10^8 y 3×10^8 células totales o células totales viables. En ciertos casos, la composición de la célula de entrada tiene una cantidad de o aproximadamente entre 1×10^6 y 1×10^{10} , entre 1×10^7 y 1×10^9 , entre 5×10^7 y 5×10^8 , o entre 1×10^8 y 3×10^8 células que expresan CD4 o CD8. En algunos casos, la composición de la célula de entrada tiene una cantidad de o aproximadamente entre 1×10^6 y 1×10^{10} , entre 1×10^7 y 1×10^9 , entre 5×10^7 y 5×10^8 , o entre 1×10^8 y 3×10^8 células T CD62L-/CCR7+/CD4+ y CD62L-/CCR7+/CD8+.

[0174] En algunos casos, la composición de células de entrada tiene o contiene al menos 1 %, al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,9 %, o 100 % o aproximadamente 100 % de células CD62L-/CCR7+. En casos particulares, la composición de la célula de entrada contiene o incluye no más del 100 %, no más del 99 %, no más del 98 %, no más del 97 %, no más del 96 %, no más del 95 %, no más de 90 %, o no más del 85 % de células CD62L-/CCR7+.

[0175] En algunos casos, una cantidad de o aproximadamente 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $3,5 \times 10^8$, $4,0 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, 5×10^8 , 5×10^8 o 1×10^9 células T CD4+ totales o viables totales se mezclan o combinan con una cantidad de o aproximadamente de 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $3,5 \times 10^8$, $4,0 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, 5×10^8 , $5,5 \times 10^8$ o 1×10^9 células T CD8+ totales o viables totales para producir una composición de células de entrada con una proporción definida de células T CD62L-/CCR7+/CD4+ a células T CD62L-/CCR7+/CD8+. En ciertos casos, entre 1×10^6 y 1×10^{10} , entre 1×10^7 y 1×10^9 , entre 5×10^7 y 5×10^8 , o entre 1×10^8 y 3×10^8 células T CD4+ totales o totales viables se mezclan o combinan con una cantidad de o aproximadamente entre 1×10^6 y 1×10^{10} , entre 1×10^7 y 1×10^9 , entre 5×10^7 y 5×10^8 , o entre 1×10^8 y 3×10^8 CD8+ T total o total viable células para producir una composición de células de entrada con una proporción definida de células T CD62L-/CCR7+/CD4+ a células T CD62L-/CCR7+/CD8+.

[0176] En casos particulares, la proporción de células T CD62L-/CCR7+/CD4+ a células T CD62L-/CCR7+/CD8+ de la composición de células de entrada se ha ajustado, cambiado y/o alterado en comparación con la proporción de células T CD62L-/CCR7+/CD4+ a células T CD62L-/CCR7+/CD8+ de una muestra, por ejemplo, una muestra biológica. En casos particulares, la proporción de células T CD62L-/CCR7+/CD4+ a células T CD62L-/CCR7+/CD8+ es o es aproximadamente o es al menos 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 100 %, 1 veces, 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, ajustado, cambiado o alterado 20 veces, 50 veces, 100 veces de la muestra biológica. En ciertos casos, la muestra es la muestra de donde se derivaron, aislaron, seleccionaron y/u obtuvieron células de la composición de células de entrada.

[0177] En algunos casos, producir, generar y/o preparar una composición de células T CD8+ incluye una o más etapas de mezclar o combinar células de una composición de células T CD4+ con células de una composición de células T CD8+ para producir una composición de células de entrada con una proporción de entre 2,2:1 a 0,8:1 células T CD45RA+/CCR7+/CD4+ a células T CD45RA+/CCR7+/CD8+. En casos particulares, el número, el número por volumen, el número por peso y/o la cantidad, nivel o porcentaje de células CD45RA+/CCR7+ se miden, evalúan y/o cuantifican en la composición de células T CD4+ y en la composición de células T CD8+ antes de mezclar o combinar. En algunos casos, la cantidad, nivel, número, número por volumen, número por peso y/o porcentaje de células CD45RA+/CCR7+ se miden, evalúan y/o cuantifican mediante la detección de células T CD45RA+/CCR7+. En casos particulares, la composición de células de entrada tiene una proporción de entre 2,2:1 a 0,8:1 de células T CD45RA+/CCR7+/CD4+ a células T CD45RA+/CCR7+/CD8+. En algunos casos, la composición de células de entrada tiene una proporción de o de aproximadamente 1,1:1 de células T CD45RA+/CCR7+/CD4+ a células T CD45RA+/CCR7+/CD8+.

[0178] En algunos casos, producir, generar y/o preparar una composición de células T CD8+ incluye una o más etapas de mezclar o combinar células de una composición de células T CD4+ con células de una composición de células T CD8+ para producir una composición de células de entrada con una proporción de entre 2,4:1 a 1:1 células T CD27+/CCR7+/CD4+ a células T CD27+/CCR7+/CD8+. En casos particulares, el número, el número por volumen, el número por peso y/o la cantidad, nivel o porcentaje de células CD27+/CCR7+ se miden, evalúan y/o cuantifican en la composición de células T CD4+ y en la composición de células T CD8+ antes de mezclar o combinar. En algunos casos, la cantidad, nivel, número, número por volumen, número por peso y/o porcentaje de células CD27+/CCR7+ se miden, evalúan y/o cuantifican mediante la detección de células T CD45RA+/CCR7+. En casos particulares, la composición de células de entrada tiene una proporción de entre 2,4:1 a 1:1 de células T CD27+/CCR7+/CD4+ a

células T CD27+/CCR7+/CD8+. En algunos casos, la composición de células de entrada tiene una proporción de o de aproximadamente 1,69:1 de células T CD27+/CCR7+/CD4+ a células T CD27+/CCR7+/CD8+.

[0179] En algunos casos, producir, generar y/o preparar una composición de células T CD8+ incluye una o más etapas de mezclar o combinar células de una composición de células T CD4+ con células de una composición de células T CD8+ para producir una composición de células de entrada con una proporción de entre 2,2:1 a 0,8:1 células T CD62L-/CCR7+/CD4+ a células T CD62L-/CCR7+/CD8+. En casos particulares, el número, el número por volumen, el número por peso y/o la cantidad, nivel o porcentaje de células CD62L-/CCR7+ se miden, evalúan y/o cuantifican en la composición de células T CD4+ y en la composición de células T CD8+ antes de mezclar o combinar. En algunos casos, la cantidad, nivel, número, número por volumen, número por peso y/o porcentaje de células CD62L-/CCR7+ se miden, evalúan y/o cuantifican mediante la detección de células T CD62L-/CCR7+. En casos particulares, la composición de células de entrada tiene una proporción de entre 2,2:1 y 0,8:1 de células T CD62L-/CCR7+/CD4+ a células T CD62L-/CCR7+/CD8+. En algunos casos, la composición de células de entrada tiene una proporción de o de aproximadamente 1,1:1 de células T CD62L-/CCR7+/CD4+ a células T CD62L-/CCR7+/CD8+.

[0180] En algunos casos, producir, generar y/o preparar una composición de células T CD8+ incluye una o más etapas de mezclar o combinar células de una composición de células T CD4+ con células de una composición de células T CD8+ para producir una composición de células de entrada con una proporción de entre 2,2:1 a 0,8:1 de células T CD4+ de tipo ingenuo a células T CD8+ de tipo ingenuo. En casos particulares, el número, el número por volumen, el número por peso y/o la cantidad, nivel o porcentaje de células de tipo ingenuo se miden, evalúan y/o cuantifican en la composición de células T CD4+ y en la composición de células T CD8+ antes de mezclar o combinar. En algunos casos, la cantidad, el nivel, el número, el número por volumen, el número por peso y/o el porcentaje de células de tipo ingenuo se miden, evalúan y/o cuantifican mediante la detección de células T CD45RA+/CCR7+. En casos particulares, la composición de células de entrada tiene una proporción de entre 2,2:1 a 0,8:1 de células T CD45RA+/CCR7+/CD4+ a células T CD45RA+/CCR7+/CD8+. En algunos casos, la composición de células de entrada tiene una proporción de o de aproximadamente 1,1:1 de células T CD45RA+/CCR7+/CD4+ a células T CD45RA+/CCR7+/CD8+.

B. Activación o estimulación de células

[0181] En algunos casos, las células se incuban y/o cultivan antes, en relación con y/o después de un proceso de ingeniería genética. En ciertos casos, las células se incuban y/o cultivan antes, durante o inmediatamente después de uno o más pasos asociados con el protocolo o proceso de ingeniería genética. Las etapas de incubación pueden incluir cultivo, cultivación, estimulación, activación y/o propagación. La incubación y/o ingeniería se puede llevar a cabo en un recipiente de cultivo, tal como una unidad, cámara, pocillo, columna, tubo, conjunto de tubos, válvula, vial, placa de cultivo, bolsa u otro recipiente para cultivo de células. En algunos casos, las composiciones o células se incuban en presencia de condiciones estimulantes o de un agente estimulante. Dichas condiciones incluyen aquellas diseñadas para inducir la proliferación, expansión, activación y/o supervivencia de células en la población, para imitar la exposición al antígeno y/o preparar las células para la ingeniería genética, tal como para la introducción de un receptor de antígeno recombinante.

[0182] En algunos casos, los métodos descritos en el presente documento incluyen uno o más pasos de incubación de células en condiciones estimulantes o activadoras. En algunos casos, las células se incuban durante aproximadamente 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 120 minutos, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días o más de 7 días. En algunos casos, las células se incuban durante entre 5 minutos y 90 minutos, entre 1 hora y 4 horas, entre 2 horas y 8 horas, entre 6 horas y 24 horas, entre 12 horas y 48 horas, entre 16 horas y 32 horas, entre 18 horas y 30 horas, entre 1 día y 4 días, o entre 2 días y 7 días. En algunos casos, las células se incuban durante entre 2 y 15 días, entre 2 y 12 días, entre 2 y 10 días, entre 2 y 8 días, entre 2 y 6 días, entre 2 y 4 días, entre 4 y 12 días, entre 4 y 10 días, entre 4 y 8 días, entre 4 y 6 días, entre 6 y 12 días, entre 6 y 10 días, entre 6 y 8 días, entre 8 y 12 días, entre 8 y 10 días, o entre 10 y 12 días. En algunos casos, las células se incuban durante al menos 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, o más de 14 días.

[0183] En algunos casos, las células se modifican genéticamente mediante un método o proceso que incluye uno o más pasos para la transferencia de genes. En algunos casos, la transferencia genética se logra estimulando primero las células, tal como incubando las células en condiciones estimulantes, por ejemplo, incubando las células con un estímulo que induce una respuesta tal como proliferación, supervivencia y/o activación, seguido de la transferencia de genes. En algunos casos, las células se incuban en condiciones estimulantes con el fin de activarlas antes de la transferencia genética. En algunos casos, la transferencia genética es o incluye la transducción de las células activadas. En casos particulares, los agentes o condiciones estimulantes inducen y/o son capaces de inducir señal primaria, señalización, estimulación, activación y/o expansión de las células.

[0184] En algunos casos, las células, por ejemplo, las células de la composición de células de entrada, se incuban en condiciones estimulantes o activadoras antes de la transferencia genética. En algunos casos, las células se incuban en condiciones estimulantes o activadoras durante aproximadamente 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 120 minutos, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas,

1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días o más de 7 días. En algunos casos, las células de la composición de células de entrada se incuban en condiciones estimulantes o activadoras durante entre 5 minutos y 90 minutos, entre 1 hora y 4 horas, entre 2 horas y 8 horas, entre 6 horas y 24 horas, entre 12 horas y 48 horas, entre 16 horas y 32 horas, entre 18 horas y 30 horas, entre 1 día y 4 días, o entre 2 días y 7 días antes de la transferencia genética. En casos particulares, las células de la composición de células de entrada se incuban en condiciones estimulantes o activadoras durante entre 2 y 15 días, entre 2 y 12 días, entre 2 y 12 días, entre 2 y 8 días, entre 2 y 6 días, entre 2 y 4 días, entre 4 y 12 días, entre 4 y 10 días, entre 4 y 8 días, entre 4 y 6 días, entre 6 y 12 días, entre 6 y 10 días, entre 6 y 8 días, entre 8 y 12 días, entre 8 y 10 días, o entre 10 y 12 días. En algunos casos, las células se incuban durante al menos 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, o más de 14 días.

[0185] En algunos casos, las células se incuban en condiciones estimulantes o activadoras durante parte o la totalidad de una transferencia genética. Por ejemplo, en ciertos casos, las células se incuban en condiciones estimulantes durante toda o una parte de la transducción o transfección de las células para introducir un ácido nucleico heterólogo. En ciertos casos, las células se incuban en condiciones estimulantes o activadoras en presencia de un vector viral, por ejemplo, un vector retroviral tal como un vector gammaretroviral o un vector lentiviral.

[0186] En casos particulares, las células se incuban en condiciones estimulantes o activadoras después, por ejemplo, inmediatamente después de la transferencia genética. En algunos casos, las células se incuban en condiciones estimulantes o activadoras después de la transferencia genética para expandir las células, por ejemplo, para expandir las células en números que sean suficientes para aplicaciones clínicas. En algunos casos, las células se incuban después de la transferencia genética en condiciones estimulantes o activadoras durante aproximadamente 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 120 minutos, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días o más de 7 días. En algunos casos, la composición de células se incuba después de la transferencia genética en condiciones estimulantes o activadoras durante entre 5 minutos y 90 minutos, entre 1 hora y 4 horas, entre 2 horas y 8 horas, entre 6 horas y 24 horas, entre 12 horas y 48 horas, entre 16 horas y 32 horas, entre 18 horas y 30 horas, entre 1 día y 4 días, o entre 2 días y 7 días antes de la transferencia genética. En algunos casos, las células de la composición se incuban después de la transferencia genética en condiciones estimulantes o activadoras durante entre 2 y 15 días, entre 2 y 12 días, entre 2 y 12 días, entre 2 y 8 días, entre 2 y 6 días, entre 2 y 4 días, entre 4 y 12 días, entre 4 y 10 días, entre 4 y 8 días, entre 4 y 6 días, entre 6 y 12 días, entre 6 y 10 días, entre 6 y 8 días, entre 8 y 12 días, entre 8 y 10 días, o entre 10 y 12 días. En algunos casos, las células se incuban durante al menos 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, o más de 14 días. En algunos casos, las células se expanden durante un período de tiempo suficiente para generar un número adecuado de células para una aplicación clínica.

[0187] Las condiciones pueden incluir uno o más de medios particulares, temperatura, contenido de oxígeno, contenido de dióxido de carbono, tiempo, agentes, por ejemplo, nutrientes, aminoácidos, antibióticos, iones y/o factores estimuladores, tales como citocinas, quimiocinas, antígenos, compañeros de unión, proteínas de fusión, receptores solubles recombinantes y cualquier otro agente diseñado para activar las células.

[0188] En algunos casos, las condiciones o agentes estimuladores inducen y/o son capaces de inducir señal primaria, señalización, estimulación, activación y/o expansión de las células.

[0189] En algunos casos, las condiciones o agentes estimulantes incluyen uno o más agentes, por ejemplo, ligando, que es capaz de activar un dominio de señalización intracelular de un complejo de TCR. En algunos aspectos, el agente activa o inicia la cascada de señalización intracelular de TCR/CD3 en una célula T. Dichos agentes pueden incluir anticuerpos, tales como los específicos de un TCR, por ejemplo anti-CD3. En algunos casos, las condiciones estimulantes incluyen uno o más agentes, por ejemplo ligando, que es capaz de estimular un receptor coestimulador, por ejemplo anti-CD28. En algunos casos, dichos agentes y/o ligandos pueden estar unidos a un soporte sólido tal como una perla y/o una o más citocinas. Opcionalmente, el método de expansión puede comprender además la etapa de añadir anticuerpo anti-CD3 y/o anti-CD28 al medio de cultivo (por ejemplo, una concentración de al menos aproximadamente 0,5 ng/ml). En algunos casos, los agentes estimulantes incluyen IL-2, IL-15 y/o IL-7. En casos particulares, el agente es un anticuerpo que se une específicamente al receptor recombinante. En casos particulares, el receptor recombinante es un receptor de unión a antígeno, por ejemplo, un CAR, y el agente es un anticuerpo antiidiotipo que se une específicamente al receptor de unión a antígeno.

[0190] En algunos casos, los agentes y/o ligandos están unidos a perlas magnéticas, tales como perlas paramagnéticas (por ejemplo, tales como Dynalbeads o MACS). En ciertos casos, las perlas se pueden retirar de las células colocando las células en un campo magnético, retirando y/o separando así las perlas de las células, por ejemplo, quitando las perlas de las células. En ciertos casos, las perlas se retiran inmediatamente después de una incubación para activar las células. En algunos casos, las perlas se eliminan antes de la administración del gen, por ejemplo mediante transducción o transfección. En ciertos casos, las perlas se eliminan durante o inmediatamente después de la entrega del gen. En casos particulares, las perlas se retiran antes o durante una incubación para expandir las células. En algunos casos, las perlas se retiran antes de recolectar y/o crioproteger las células.

[0191] En algunos aspectos, la incubación se lleva a cabo de acuerdo con técnicas tales como las descritas en la patente de EE. UU. nº 6.040.177 de Riddell et al, Klebanoff et al. (2012) J Immunother. 35(9): 651-660, Terakuraetal. (2012) Blood. 1:72-82 y/o Wangetal. (2012) J Immunother. 35(9):689-701.

[0192] En algunos casos, las células T se expanden añadiendo células alimentadoras a una composición iniciadora de cultivo, tales como células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que no se dividen (por ejemplo, de manera que la población de células resultante contenga al menos aproximadamente 5, 10, 20, o 40 o más células alimentadoras de PBMC por cada linfocito T en la población inicial que se va a expandir); e incubar el cultivo (por ejemplo, durante un tiempo suficiente para ampliar el número de células T). En algunos aspectos, las células alimentadoras que no se dividen pueden comprender células alimentadoras de PBMC irradiadas con rayos gamma. En algunos casos, las PBMC se irradian con rayos gamma en el rango de aproximadamente 3000 a 3600 rads para evitar la división celular. En algunos aspectos, las células alimentadoras se añaden al medio de cultivo antes de la adición de las poblaciones de células T.

[0193] En algunos casos, las condiciones estimulantes incluyen una temperatura adecuada para el crecimiento de linfocitos T humanos, por ejemplo, al menos aproximadamente 25 grados Celsius, generalmente al menos aproximadamente 30 grados y generalmente a o aproximadamente 37 grados Celsius. Opcionalmente, la incubación puede comprender además la adición de células linfoblastoides (LCL) transformadas con EBV que no se dividen como células alimentadoras. El LCL se puede irradiar con rayos gamma en el rango de aproximadamente 6.000 a 10.000 rads. Las células alimentadoras de LCL en algunos aspectos se proporcionan en cualquier cantidad adecuada, tal como una proporción de células alimentadoras de LCL a linfocitos T iniciales de al menos aproximadamente 10:1.

[0194] En algunos casos, las células T específicas de antígeno, tales como las células T CD4+ y/o CD8+ específicas de antígeno, se obtienen estimulando linfocitos T de tipo ingenuo o específicos de antígeno con antígeno. Por ejemplo, se pueden generar líneas o clones de células T específicas de antígeno para antígenos de citomegalovirus aislando células T de sujetos infectados y estimulando las células in vitro con el mismo antígeno.

C. Ingeniería genética

[0195] En algunos casos, los métodos descritos implican generar o producir una composición de células diseñadas, por ejemplo, una composición de células que contiene células que expresan un receptor de antígeno recombinante. Son bien conocidos varios métodos para la introducción de componentes genéticamente modificados, por ejemplo, receptores recombinantes, por ejemplo, CAR o TCR, y pueden usarse con los métodos y composiciones descritos. Los métodos ejemplares incluyen aquellos para la transferencia de ácidos nucleicos que codifican los receptores, incluyendo vía viral, por ejemplo, retroviral o lentiviral, transducción, transposones y electroporación.

[0196] En ciertos casos, las células de la composición de células de entrada se ponen en contacto y/o se introducen con uno o más agentes que contienen un ácido nucleico, por ejemplo, que engloban un receptor recombinante tal como un CAR. En algunos casos, el agente es un vector, por ejemplo, un vector viral, un plásmido o un transposón. En algunos casos, las células son células T CD4+. En ciertos casos, las células son células T CD8+. En casos particulares, la introducción y/o el contacto de las células con el ácido nucleico da como resultado células modificadas genéticamente con una proporción definida, deseada o fija de células T CD4+ modificadas con respecto a células T CD8+ modificadas. En algunos casos, los ácidos nucleicos son heterólogos, es decir, normalmente no están presentes en una célula o muestra obtenida de la célula, tal como una obtenida de otro organismo o célula, que por ejemplo, normalmente no se encuentra en la célula que se está diseñando y/o un organismo del que deriva dicha célula. En algunos casos, los ácidos nucleicos no se producen de forma natural, tal como un ácido nucleico que no se encuentra en la naturaleza, incluido uno que comprende combinaciones quiméricas de ácidos nucleicos que codifican varios dominios de múltiples tipos de células diferentes.

[0197] En algunos casos, los métodos de preparación incluyen etapas para congelar, por ejemplo, criopreservación, las células, ya sea antes, tal como inmediatamente antes, durante o después, tal como inmediatamente después, de cualquiera de las etapas o etapas de ingeniería genética y/o producción de una composición de células de salida que contiene células modificadas genéticamente. En ciertos casos, las células se criocongelan antes, durante o después de las etapas de aislar o seleccionar las células, mezclar o combinar células en una composición de células de entrada, incubación, activación, transferencia de genes, transducción, transfección, expansión y/o recolección. En algunos casos, todas o algunas de las células se recogen mediante congelación. En algunos casos, una parte de las células se recolecta antes, durante o después de una etapa o paso en el proceso de ingeniería genética de las células mucho más tarde o de un análisis posterior, por ejemplo, tal como un análisis después de que se haya administrado a un sujeto una composición de las células diseñadas.

[0198] En algunos casos, el paso de congelación y posterior descongelación elimina los granulocitos y, en cierta medida, los monocitos de la población celular. En algunos casos, las células se suspenden en una solución congelada, por ejemplo, después de una etapa de lavado para eliminar el plasma y las plaquetas. Se puede utilizar cualquiera de una variedad de soluciones y parámetros de congelación conocidos en algunos aspectos. Un ejemplo implica el uso de PBS que contiene 20 % de DMSO y 8 % de albúmina sérica humana (HSA), u otros medios de congelación de células adecuados. A continuación, se diluye 1:1 con medio para que la concentración final de DMSO y HSA sea del

10 % y el 4 %, respectivamente. A continuación, las células generalmente se congelan a -80 °C a una velocidad de 1 °C por minuto y se almacenan en la fase de vapor de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido.

1. Vectores y métodos de ingeniería genética

[0199] En algunos casos, los ácidos nucleicos recombinantes se transfieren a células usando partículas de virus infecciosos recombinantes, tales como, por ejemplo, vectores derivados del virus 40 de simio (SV40), adenovirus, virus adenoasociados (AAV). En algunos casos, los ácidos nucleicos recombinantes se transfieren a células T utilizando vectores lentivirales recombinantes o vectores retrovirales, como vectores gamma-retrovirales (véase, por ejemplo, Koste et al. (2014) *Gene Therapy* 2014 Abril 3. doi: 10.1038/gt. 2014.25; Carlens et al. (2000) *Exp Hematol* 28(10): 1137-46; Alonso-Camino et al. (2013) *Mol Ther Nucl Acids* 2, e93; Park et al, *Trends Biotechnol.* 2011 noviembre 29(11): 550 - 557. En algunos casos, el virus es un virus adenoasociado (AAV).

[0200] En algunos casos, el vector retroviral tiene una secuencia repetida terminal larga (LTR), por ejemplo, un vector retroviral derivado del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV), virus del sarcoma mieloproliferativo (MPSV), virus de células madre embrionarias murinas (MESV), virus de células madre embrionarias murinas (MESV), virus de células madre (MSCV), virus formador de focos del bazo (SFFV). La mayoría de los vectores retrovirales se derivan de retrovirus murinos. En algunos casos, los retrovirus incluyen aquellos derivados de cualquier fuente de células de ave o mamífero. Los retrovirus suelen ser anfotrópicos, lo que significa que son capaces de infectar células huésped de varias especies, incluidos los humanos. En un caso, el gen que se va a expresar reemplaza las secuencias retrovirales gag, pol y/o env. Se han descrito varios sistemas retrovirales ilustrativos (por ejemplo, patentes estadounidenses números 5.219.740; 6.207.453; 5.219.740; Miller y Rosman (1989) *BioTechniques* 7:980-990; Miller, AD (1990) *Human Gene Therapy* 1:5-14. Scarpa y otros (1991) *Virology* 180:849-852, Burns y otros (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 90:8033-8037 y Boris-Lawrie y Temin (1993) *Cur. Opin. Genet Desarrollar* 3:102-109.

[0201] Se conocen métodos de transducción lentiviral. Se describen métodos ejemplares, por ejemplo, en Wang et al. (2012) *J. Immunother.* 35(9): 689-701; Cooper et al. (2003) *Blood.* 101:1637-1644; Verhoeven et al. (2009) *Methods Mol Biol.* 506: 97-114; y Cavalieri et al. (2003) *Blood.* 102(2): 497-505.

[0202] En algunos casos, las partículas de vector viral contienen un genoma derivado de un vector basado en genoma retroviral, tal como derivado de un genoma lentiviral o un vector basado en gammaretroviral. En algunos aspectos de los vectores virales divulgados, el ácido nucleico heterólogo que codifica un receptor recombinante, tal como un receptor de antígeno, tal como un CAR, está contenido y/o ubicado entre las secuencias 5'LTR y 3'LTR del genoma del vector.

[0203] En algunos casos, el genoma del vector viral es un genoma de lentivirus, tal como un genoma de VIH-1 o un genoma de VIS. Por ejemplo, se han generado vectores lentivirales atenuando múltiples genes de virulencia; por ejemplo, los genes env, vif, vpr, vpu y nef pueden eliminarse, haciendo que el vector sea más seguro para fines terapéuticos. Se conocen vectores lentivirales. Véase Naldini et al, (1996 y 1998); Zufferey y otros, (1997); Dull et al, 1998, patente de EE. UU. N^{os} 6.013.516; y 5.994.136). En algunos casos, estos vectores virales están basados en plásmidos o en virus y están configurados para portar las secuencias esenciales para incorporar ácido nucleico extraño, para la selección y para la transferencia del ácido nucleico a una célula huésped. Los lentivirus conocidos pueden obtenerse fácilmente de depósitos o colecciones tales como la American Type Culture Collection ("ATCC"; 10801 University Blvd, Manassas, Va. 20110-2209), o aislarse de fuentes conocidas usando técnicas comúnmente disponibles.

[0204] Los ejemplos no limitantes de vectores lentivirales incluyen aquellos derivados de un lentivirus, tales como el Virus de Inmunodeficiencia Humana 1 (VIH-1), VIH-2, un Virus de Inmunodeficiencia de Simios (VIS), el Virus Linfotrópico T Humano 1 (HTLV-1), HTLV-2 o virus de la anemia por infección equina (EIAV). Por ejemplo, se han generado vectores lentivirales atenuando multiplicadamente los genes de virulencia del VIH; por ejemplo, se eliminan los genes env, vif, vpr, vpu y nef, lo que hace que el vector sea más seguro para fines terapéuticos. Los vectores lentivíricos son conocidos en la técnica, véase Naldini et al, (1996 y 1998); Zufferey y otros, (1997); Dull et al, 1998, patente de EE. UU. N^{os} 6.013.516; y 5.994.136). En algunos casos, estos vectores virales están basados en plásmidos o en virus y están configurados para portar las secuencias esenciales para incorporar ácido nucleico extraño, para la selección y para la transferencia del ácido nucleico a una célula huésped. Los lentivirus conocidos pueden obtenerse fácilmente de depósitos o colecciones tales como la American Type Culture Collection ("ATCC"; 10801 University Blvd, Manassas, Va. 20110-2209), o aislarse de fuentes conocidas usando técnicas comúnmente disponibles.

[0205] En algunos casos, el vector genético viral puede contener secuencias de las LTR 5' y 3' de un retrovirus, tal como un lentivirus. En algunos aspectos, la construcción del genoma viral puede contener secuencias de las LTR 5' y 3' de un lentivirus, y en particular puede contener las secuencias R y U5 de la LTR 5' de un lentivirus y una LTR 3' inactivada o autoinactivada. de un lentivirus. Las secuencias LTR pueden ser secuencias LTR de cualquier lentivirus de cualquier especie. Por ejemplo, pueden ser secuencias LTR de VIH, SIV, FIV o BIV. Normalmente, las secuencias LTR son secuencias LTR de VIH.

[0206] En algunos casos, el ácido nucleico de un vector viral, tal como un vector viral del VIH, carece de unidades transcripcionales adicionales. El genoma del vector puede contener una 3' LTR inactivada o autoinactivada (Zufferey et al. J Viral 72: 9873, 1998; Miyoshi et al, J Virol 72:8150, 1998). Por ejemplo, la delección en la región U3 de la LTR 3' del ácido nucleico usado para producir el ARN del vector viral se puede usar para generar vectores autoinactivantes (SIN). Esta delección puede luego transferirse a la LTR 5' del ADN proviral durante la transcripción inversa. Un vector autoinactivante generalmente tiene una delección de las secuencias potenciadoras y promotoras de la repetición terminal larga (LTR) 3', que se copia en la LTR 5' durante la integración del vector. En algunos casos se puede eliminar suficiente secuencia, incluida la eliminación de una caja TATA, para abolir la actividad transcripcional de la LTR. Esto puede impedir la producción de ARN vectorial de longitud completa en células transducidas. En algunos aspectos, el elemento U3 de la LTR 3' contiene una delección de su secuencia potenciadora, los sitios de caja TATA, Spl y NF-kappa B. Como resultado de la 3' LTR autoinactivante, el provirus que se genera después de la entrada y la transcripción inversa contiene una 5' LTR inactivada. Esto puede mejorar la seguridad al reducir el riesgo de movilización del genoma del vector y la influencia de la LTR en los promotores celulares cercanos. La LTR 3' autoinactivante puede construirse mediante cualquier método conocido en la técnica. En algunos casos, esto no afecta los títulos del vector ni las propiedades in vitro o in vivo del vector.

[0207] Opcionalmente, la secuencia U3 de la LTR 5' lentivírica se puede reemplazar con una secuencia promotora en la construcción viral, tal como una secuencia promotora heteróloga. Esto puede aumentar el título del virus recuperado de la línea celular empaquetadora. También se puede incluir una secuencia potenciadora. Puede usarse cualquier combinación de potenciador/promotor que aumente la expresión del genoma de ARN viral en la línea celular empaquetadora. En un ejemplo, se usa la secuencia potenciadora/promotora de CMV (patente estadounidense n.º 5.385.839 y patente estadounidense n.º 5.168.062).

[0208] En ciertos casos, el riesgo de mutagénesis por inserción se puede minimizar construyendo el genoma del vector retroviral, tal como el genoma del vector lentiviral, para que tenga una integración defectuosa. Se pueden seguir diversos enfoques para producir un genoma de vector no integrador. En algunos casos, se pueden diseñar mutaciones en el componente de la enzima integrasa del gen pol, de modo que encadene una proteína con una integrasa inactiva. En algunos casos, el propio genoma del vector puede modificarse para evitar la integración, por ejemplo, mutando o eliminando uno o ambos sitios de unión, o haciendo que el tracto de polipurina proximal (PPT) 3' LTR no funcional mediante eliminación o modificación. En algunos casos, se encuentran disponibles enfoques no genéticos; estos incluyen agentes farmacológicos que inhiben una o más funciones de la integrasa. Los enfoques no son mutuamente excluyentes; es decir, se puede utilizar más de uno a la vez. Por ejemplo, tanto la integrasa como los sitios de unión pueden ser no funcionales, o la integrasa y el sitio PPT pueden ser no funcionales, o los sitios de unión y el sitio PPT pueden ser no funcionales, o todos ellos pueden ser no funcionales. Dichos métodos y genomas de vectores virales son conocidos y están disponibles (véase Philpott y Thrasher, Human Gene Therapy 18:483, 2007; Engelman et al. J Virol 69:2729, 1995; Brown et al J Virol 73:9011 (1999); WO 2009/076524; McWilliams et al, J Viral 77:11150, 2003; Powell y Levin J Virol 70:5288, 1996).

[0209] En algunos casos, los métodos descritos implican métodos de transducción de células poniendo en contacto, por ejemplo, incubando, una composición de células que comprende una pluralidad de células con una partícula viral. En algunos casos, las células que se van a transfectar o transducir son o comprenden células primarias obtenidas de un sujeto, tales como células enriquecidas y/o seleccionadas de un sujeto.

[0210] En algunos casos, la concentración de células a transducir de la composición es de o desde aproximadamente $1,0 \times 10^5$ células/ml a $1,0 \times 10^8$ células/ml, tal como al menos o aproximadamente al menos o aproximadamente $1,0 \times 10^5$ células/ml, 5×10^5 células/ml, 1×10^6 células/ml, 5×10^6 células/ml, 1×10^7 células/ml, 5×10^7 células/ml o 1×10^8 células/ml.

[0211] En algunos casos, las partículas virales se proporcionan en una determinada proporción de copias de las partículas del vector viral o unidades infecciosas (UI) de las mismas, por el número total de células a transducir (UI/célula). Por ejemplo, en algunos casos, las partículas virales están presentes durante el contacto en o aproximadamente o al menos en o aproximadamente 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 o 60 UI de las partículas del vector viral por una de las células.

[0212] En algunos casos, el título de partículas de vector viral está entre o entre aproximadamente 1×10^6 UI/ml y 1×10^8 UI/ml, tal como entre o entre aproximadamente 5×10^6 UI/ml y 5×10^7 UI/ml. como al menos 6×10^6 UI/ml, 7×10^6 UI/ml, 8×10^6 UI/ml, 9×10^6 UI/ml, 1×10^7 UI/ml, 2×10^7 UI/ml, 3×10^7 UI/ml, 4×10^7 UI/ml o 5×10^7 UI/ml.

[0213] En algunos casos, la transducción se puede lograr con una multiplicidad de infección (MOI) de menos de 100, tal como generalmente menos de 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5 o menos.

[0214] En algunos casos, el método implica poner en contacto o incubar las células con las partículas virales. En algunos casos, el contacto es durante 30 minutos a 72 horas, tal como 30 minutos a 48 horas, 30 minutos a 24 horas o 1 hora a 24 horas, tal como al menos o aproximadamente al menos 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 36 horas o más.

[0215] En algunos casos, el contacto se puede efectuar con centrifugación, como por ejemplo espinoculación (por ejemplo, inoculación centrífuga). En algunos casos, la composición que contiene células, partículas virales y reactivo se puede hacer girar, generalmente con una fuerza o velocidad relativamente baja, tal como una velocidad inferior a la utilizada para sedimentar las células, tal como desde o desde aproximadamente 600 rpm hasta 1700 rpm (p. ej., a o alrededor de o al menos 600 rpm, 1000 rpm, o 1500 rpm o 1700 rpm). En algunos casos, la rotación se realiza mediante una fuerza, por ejemplo, una fuerza centrífuga relativa. fuerza, de o desde aproximadamente 100 g a 3200 g (por ejemplo, en o aproximadamente o al menos en o aproximadamente 100 g, 200 g, 300 g, 400 g, 500 g, 1000 g, 1500 g, 2000 g, 2500 g, 3000 g o 3200 g), medido por ejemplo en una pared interna o externa de la cámara o cavidad. El término "fuerza centrífuga relativa" o RCF se entiende generalmente como la fuerza efectiva impartida sobre un objeto o sustancia (tal como una célula, muestra o sedimento y/o un punto en la cámara u otro recipiente que se está girando), relativa a la fuerza gravitacional de la Tierra, en un punto particular del espacio en comparación con el eje de rotación. El valor se puede determinar mediante fórmulas conocidas, teniendo en cuenta la fuerza gravitacional, la velocidad de rotación y el radio de rotación (distancia desde el eje de rotación y el objeto, sustancia o partícula en el que se mide el RCF).

[0216] En ciertos casos, las células de entrada se tratan, incuban o se ponen en contacto con partículas que comprenden moléculas de unión que se unen o reconocen el receptor recombinante codificado por el ADN viral.

[0217] En algunos casos, los ácidos nucleicos recombinantes se transfieren a células T mediante electroporación (véase, por ejemplo, Chicaybam et al. (2013) PLoS ONE 8(3): e60298 y Van Tedeloo et al. (2000) Gene Therapy 7(16): 1431-1437). En algunos casos, los ácidos nucleicos recombinantes se transfieren a células T mediante transposición (véase, por ejemplo, Manuri et al. (2010) Hum Gene Ther 21(4): 427-437; Sharma et al. (2013) Molec Ther Nucl Acids 2, e74 y Huang et al. (2009) Methods Mol Biol 506: 115-126). Otros métodos para introducir y expresar material genético en células inmunes incluyen transfección con fosfato cálcico (por ejemplo, como se describe en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, NY), fusión de protoplastos, transfección mediada por liposomas catiónicos; bombardeo de micropartículas facilitado por partículas de tungsteno (Johnston, Nature, 346: 776-777 (1990)); y coprecipitación de ADN con fosfato de estroncio (Brash et al, Mol. Cell Biol, 7: 2031-2034 (1987)).

[0218] Otros enfoques y vectores para la transferencia de los ácidos nucleicos que codifican los productos recombinantes son los descritos, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional, publicación número: WO2014055668 y patente estadounidense número 7.446.190.

[0219] En algunos casos, los ácidos nucleicos recombinantes se transfieren a las células T mediante transposones. Ejemplos de transposones adecuados para su uso con células de mamíferos, por ejemplo, leucocitos primarios humanos, incluyen, entre otros, La Bella Durmiente y Piggybac. La transfección basada en transposones es un sistema de dos componentes que consta de una transposasa y un transposón. En algunos casos, el sistema comprende un transposón diseñado para comprender un ADN extraño (también denominado aquí ADN de carga), por ejemplo, un gen que codifica un receptor recombinante, que está flanqueado por secuencias de repetición invertida/repetición directa (IR/DR) que son reconocidos por una transposasa que los acompaña. En algunos casos, un plásmido no viral codifica una transposasa bajo el control de un promotor. En algunos casos, la transfección del plásmido en una célula huésped da como resultado una expresión transitoria de la transposasa a niveles suficientes para integrar el transposón en el ADN genómico.

[0220] La Bella Durmiente (SB) es un miembro sintético de la superfamilia de transposones Tc/1-mariner, reconstruido a partir de elementos latentes alojados en el genoma de los peces salmónidos. La transfección basada en transposones SB es un sistema de dos componentes que consta de una transposasa y un transposón que contiene secuencias de repetición invertida/repetición directa (IR/DR) que dan como resultado una integración precisa en un dinucleótido TA. El transposón está diseñado con un casete de expresión de interés flanqueado por IR/DR. La transposasa SB se une a sitios de unión específicos que se encuentran en el IR del transposón de La Bella Durmiente. La transposasa SB media la integración del transposón, un elemento móvil que codifica una secuencia de carga flanqueada en ambos lados por repeticiones terminales invertidas que albergan sitios de unión para la enzima catalítica (SB). La expresión estable se produce cuando SB inserta secuencias genéticas en los cromosomas de los vertebrados en un dinucleótido objetivo TA mediante un mecanismo de cortar y pegar. Este sistema se ha utilizado para diseñar una variedad de tipos de células de vertebrados, incluidos los leucocitos primarios de sangre periférica humana. En algunos casos, las células se ponen en contacto, se incuban y/o se tratan con un transposón SB que comprende un gen de carga, por ejemplo, un gen que codifica un receptor recombinante o un CAR, flanqueado por secuencias IR de SB. En casos particulares, las células que se van a transfectar se ponen en contacto, se incuban y/o se tratan con un plásmido que comprende un transposón SB que comprende un gen de carga, por ejemplo, un gen que codifica un CAR, flanqueado por secuencias IR de SB. En ciertos casos, el plásmido comprende además un gen que codifica una transposasa de SB que no está flanqueada por secuencias IR de SB.

[0221] PiggyBac (PB) es otro sistema de transposones que se puede utilizar para integrar ADN de carga en el ADN genómico de un huésped, por ejemplo de un ser humano. La transposasa PB reconoce secuencias repetidas terminales invertidas (ITR) específicas del transposón PB ubicadas en ambos extremos del transposón y mueve eficientemente el contenido de los sitios originales y los integra eficientemente en los sitios cromosómicos TTAA. El

sistema de transposones PB permite que los genes de interés entre las dos ITR en el vector PB se movilicen en genomas diana. El sistema PB se ha utilizado para diseñar una variedad de tipos de células de vertebrados, incluidas células humanas primarias. En algunos casos, las células que se van a transfectar se ponen en contacto, se incuban y/o se tratan con un transposón de PB que comprende un gen de carga, por ejemplo, un gen que codifica un CAR, flanqueado por secuencias IR de PB. En casos particulares, las células que se van a transfectar se ponen en contacto, se incuban y/o se tratan con un plásmido que comprende un transposón de PB que comprende un gen de carga, por ejemplo, un gen que codifica un CAR, flanqueado por secuencias IR de PB. En ciertos casos, el plásmido comprende además un gen que codifica una transposasa SB que no está flanqueada por secuencias PB IR.

[0222] En algunos casos, la transducción con transposones se realiza con un plásmido que comprende un gen de transposasa y un plásmido que comprende un transposón que contiene una secuencia de ADN carga que está flanqueada por secuencias de repetición invertida/repetición directa (IR/DR) que son reconocidas por la transposasa. En ciertos casos, la secuencia de ADN carga encadena una proteína heteróloga, por ejemplo, un receptor de células T recombinante o un CAR. En algunos casos, el plásmido comprende transposasa y el transposón. En algunos casos, la transposasa está bajo el control de un promotor ubicuo, o cualquier promotor adecuado para impulsar la expresión de la transposasa en la célula diana. Los promotores ubicuos incluyen, entre otros, EFla, CMB, SV40, PGKI, Ubc, actina β humana, CAG, TRE, UAS, Ac5, CaMKIIa y U6. En algunos casos, el ADN carga comprende un casete de selección que permite la selección de células con integración estable del ADN carga en el ADN genómico. Los casetes de selección adecuados incluyen, entre otros, casetes de selección que codifican un gen de resistencia a la kanamicina, un gen de resistencia a la espectinomicina, un gen de resistencia a la estreptomycinina, un gen de resistencia a la ampicilina, un gen de resistencia a la carbenicilina, un gen de resistencia a la higromicina, un gen de resistencia a la bleomicina, un gen de resistencia a la eritromicina y polimixina B. gen de resistencia.

[0223] En algunos casos, los componentes para la transducción con un transposón, por ejemplo, plásmidos que comprenden una transposasa SB y un transposón SB, se introducen en la célula diana. Se puede emplear cualquier protocolo conveniente, donde el protocolo puede proporcionar la introducción in vitro o in vivo de los componentes del sistema en la célula diana, dependiendo de la ubicación de la célula diana. Por ejemplo, cuando la célula diana es una célula aislada, el sistema puede introducirse directamente en la célula en condiciones de cultivo celular que permitan la viabilidad de la célula diana, por ejemplo, utilizando técnicas de transformación estándar. Dichas técnicas incluyen, entre otras: infección viral, transformación, conjugación, fusión de protoplastos, electroporación, tecnología de pistola de partículas, precipitación con fosfato cálcico, microinyección directa, administración de vectores virales y similares. La elección del método depende generalmente del tipo de célula que se transforma y de las circunstancias bajo las cuales se produce la transformación (es decir, in vitro, ex vivo o in vivo). Puede encontrarse una discusión general de estos métodos en Ausubel, et al, Short Protocols in Molecular Biology, 3ª ed, Wiley & Sons, 1995.

[0224] En algunos casos, el transposón SB y la fuente de transposasa SB se introducen en una célula diana de un organismo multicelular, por ejemplo, un mamífero o un ser humano, en condiciones suficientes para la escisión del ácido nucleico flanqueado por repetición invertida del vector que porta el transposón y la integración posterior del ácido nucleico escindido en el genoma de la célula diana. Algunos casos comprenden además una etapa para garantizar que la actividad transposasa requerida esté presente en la célula diana junto con el transposón introducido. Dependiendo de la estructura del propio vector transposón, es decir, si el vector incluye o no una región que codifica un producto que tiene actividad transposasa, el método puede incluir además la introducción de un segundo vector en la célula diana que encadene la actividad transposasa requerida.

[0225] En algunos casos, la cantidad de ácido nucleico vector que comprende el transposón y la cantidad de ácido nucleico vector que codifica la transposasa que se introduce en la célula es suficiente para proporcionar la escisión e inserción deseadas del ácido nucleico transposón en el genoma de la célula diana. Como tal, la cantidad de ácido nucleico vector introducida debe proporcionar una cantidad suficiente de actividad transposasa y un número de copias suficiente del ácido nucleico que se desea insertar en la célula diana. La cantidad de ácido nucleico vector que se introduce en la célula diana varía dependiendo de la eficacia del protocolo de introducción particular que se emplea, por ejemplo, el protocolo de administración ex vivo particular que se emplea.

[0226] Una vez que el ADN del vector ha entrado en la célula diana en combinación con la transposasa necesaria, la región de ácido nucleico del vector que está flanqueada por repeticiones invertidas, es decir, el ácido nucleico del vector situado entre las repeticiones invertidas reconocidas por la transposasa de La Bella Durmiente, se escinde del vector a través de la transposasa descrita y se inserta en el genoma de la célula objetivo. Como tal, a la introducción del ADN del vector en la célula diana le sigue una escisión posterior mediada por transposasa y la inserción del ácido nucleico exógeno transportado por el vector en el genoma de la célula diana. En casos particulares, el vector está integrado en los genomas de al menos el 1 %, al menos el 2 %, al menos el 3 %, al menos el 4 %, al menos el 5 %, al menos el 6 %, al menos el 7 %, al menos el 8 %, al menos el 9 %, al menos el 10 %, al menos el 15 % o al menos el 20 % de las células que se transfectan con el transposón SB y/o la transposasa SB. En algunos casos, la integración del ácido nucleico en el genoma de la célula diana es estable, es decir, el ácido nucleico vector permanece presente en el genoma de la célula diana durante más de un período de tiempo transitorio y pasa a través de una parte del material genético cromosómico a la descendencia de la célula diana.

[0227] En determinados casos, los transposones se utilizan para integrar ácidos nucleicos, es decir, polinucleótidos, de diversos tamaños en el genoma de la célula diana. En algunos casos, el tamaño del ADN que se inserta en el genoma de una célula diana utilizando los métodos en cuestión varía de aproximadamente 0,1 kb a 200 kb, de aproximadamente 0,5 kb a 100 kb, de aproximadamente 1,0 kb a aproximadamente 8,0 kb, de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 200 kb, de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 10 kb, de aproximadamente 10 kb a aproximadamente 50 kb, de aproximadamente 50 kb a aproximadamente 100 kb, o de aproximadamente 100 kb a aproximadamente 200 kb. En algunos casos, el tamaño del ADN que se inserta en el genoma de una célula diana utilizando los métodos en cuestión oscila entre aproximadamente 1,0 kb y aproximadamente 8,0 kb. En algunos casos, el tamaño del ADN que se inserta en el genoma de una célula diana utilizando los métodos en cuestión oscila entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 200 kb. En casos particulares, el tamaño del ADN que se inserta en el genoma de una célula diana usando los métodos en cuestión varía de aproximadamente 1,0 kb a aproximadamente 8,0 kb.

[0228] En algunos casos, las células, por ejemplo, células T, pueden transfectarse durante o después de la expansión, por ejemplo con un receptor de células T (TCR) o un receptor de antígeno quimérico (CAR). Esta transfección para la introducción del gen del receptor deseado se puede realizar, por ejemplo, con cualquier vector retroviral adecuado. La población de células genéticamente modificadas puede entonces liberarse del estímulo inicial (por ejemplo, el estímulo anti-CD3/anti-CD28) y estimularse a continuación con un segundo tipo de estímulo, por ejemplo a través de un receptor introducido de novo). Este segundo tipo de estímulo puede incluir un estímulo antigénico en forma de una molécula de péptido/MHC, el ligando afín (entrecruzado) del receptor introducido genéticamente (por ejemplo, ligando natural de un CAR) o cualquier ligando (tal como un anticuerpo) que directamente se une dentro del marco del nuevo receptor (por ejemplo, reconociendo regiones constantes dentro del receptor). Véase, por ejemplo, Cheadle et al, "Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy" *Methods Mol Biol.* 2012; 907:645-66 o Barrett et al, Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer *Annual Review of Medicine* vol. 65: 333-347 (2014).

[0229] En algunos casos, se puede usar un vector que no requiere que las células, por ejemplo, células T, estén activadas. En algunos de estos casos, las células pueden seleccionarse y/o transducirse antes de la activación. Por lo tanto, las células pueden diseñarse antes o después del cultivo de las células y, en algunos casos, al mismo tiempo o durante al menos una parte del cultivo.

[0230] Entre los ácidos nucleicos adicionales, por ejemplo, genes para introducción, se encuentran aquellos para mejorar la eficacia de la terapia, tal como promoviendo la viabilidad y/o función de las células transferidas; genes para proporcionar un marcador genético para la selección y/o evaluación de las células, tal como para evaluar la supervivencia o localización in vivo; genes para mejorar la seguridad, por ejemplo, haciendo que la célula sea susceptible a la selección negativa in vivo como describen Lupton SD et al, *Mol. y Cell Biol.* 11:6 (1991); y Riddell et al, *Human Gene Therapy* 3:319-338 (1992); véanse también las publicaciones PCT/US91/08442 y PCT/US94/05601 de Lupton et al. que describe el uso de genes de fusión seleccionables bifuncionales derivados de la fusión de un marcador seleccionable positivo dominante con un marcador seleccionable negativo. Véase, por ejemplo, Riddell et al, Patente de EE. UU. núm. 6.040.177, en las columnas 14-17.

2. Receptores recombinantes

[0231] En algunos casos, las células para su uso o administración en relación con los métodos descritos contienen o están diseñadas para contener un receptor diseñado, por ejemplo, un receptor de antígeno diseñado, tal como un receptor de antígeno quimérico (CAR), o un receptor de células T (TCR). También se describen poblaciones de dichas células, composiciones que contienen dichas células y/o enriquecidas en dichas células, tales como en las que se enriquecen o seleccionan células de un cierto tipo tales como células T o células T CD8+ o CD4+. Entre las composiciones se encuentran composiciones y formulaciones farmacéuticas para administración, tales como para terapia celular adoptiva. También se describen métodos para administrar las células y composiciones a sujetos, por ejemplo, pacientes, de acuerdo con los métodos descritos y/o con los artículos de fabricación o composiciones divulgados.

[0232] En algunos casos, las células incluyen uno o más ácidos nucleicos introducidos mediante ingeniería genética y, por lo tanto, expresan productos recombinantes o genéticamente modificados de dichos ácidos nucleicos. En algunos casos, la transferencia de genes se logra estimulando primero las células, tal como combinándolas con un estímulo que induce una respuesta tal como proliferación, supervivencia y/o activación, por ejemplo, medida por la expresión de una citoquina o marcador de activación, seguido de la transducción de las células activadas y la expansión del cultivo a números suficientes para aplicaciones clínicas.

[0233] Las células generalmente expresan receptores recombinantes, tales como receptores de antígenos que incluyen receptores de antígenos no TCR funcionales, por ejemplo, receptores de antígenos quiméricos (CAR), y otros receptores de unión a antígeno tales como receptores de células T transgénicas (TCR). También entre los receptores se encuentran otros receptores quiméricos.

a. Receptores de antígenos quiméricos (CAR)

[0234] En algunos casos de los métodos y usos descritos, los receptores quiméricos, tales como receptores de antígenos quiméricos, contienen uno o más dominios que combinan un dominio de unión a ligando (por ejemplo, anticuerpo o fragmento de anticuerpo) que proporciona especificidad para un antígeno deseado (por ejemplo, tumor). antígeno) con dominios de señalización intracelular. En algunos casos, el dominio de señalización intracelular es un dominio de activación intracelular, tal como un dominio de activación de células T, que proporciona una señal de activación primaria. En algunos casos, el dominio de señalización intracelular contiene o contiene adicionalmente un dominio de señalización coestimulador para facilitar las funciones efectoras. En algunos casos, los receptores quiméricos, cuando se modifican genéticamente en células inmunes, pueden modular la actividad de las células T y, en algunos casos, pueden modular la diferenciación u homeostasis de las células T, dando como resultado células genéticamente modificadas con mayor longevidad, supervivencia y/o persistencia in vivo tales como para uso en métodos de terapia celular adoptiva.

[0235] En algunos casos, se describen células modificadas genéticamente, como las células T, que expresan un CAR con especificidad por un antígeno (o marcador o ligando) particular, tal como un antígeno expresado en la superficie de un tipo de célula particular. En algunos casos, el antígeno es un polipéptido. En algunos casos, es un carbohidrato u otra molécula. En algunos casos, el antígeno se expresa selectivamente o se sobreexpresa en células de la enfermedad o afección, por ejemplo, el tumor o las células patógenas, en comparación con células o tejidos normales o no diana. En otros casos, el antígeno se expresa en células normales y/o se expresa en células modificadas genéticamente.

[0236] En casos particulares, el receptor recombinante, tal como el receptor quimérico, contiene una región de señalización intracelular, que incluye un dominio de señalización citoplasmático (también llamado indistintamente dominio de señalización intracelular), tal como una región citoplasmática (intracelular) capaz de inducir una señal de activación primaria en una célula T, por ejemplo, un dominio de señalización citoplasmático de un componente del receptor de células T (TCR) (por ejemplo, un dominio de señalización citoplasmático de una cadena zeta de una cadena CD3-zeta (CD3) o una variante funcional o un puerto de señalización de la misma) y/ o que comprende un motivo de activación basado en tirosina de inmunorreceptor (ITAM).

[0237] En algunos casos, el receptor quimérico contiene además un dominio de unión a ligando extracelular que se une específicamente a un antígeno ligando (por ejemplo, antígeno). En algunos casos, el receptor quimérico es un CAR que contiene un dominio de reconocimiento de antígeno extracelular que se une específicamente a un antígeno. En algunos casos, el ligando, como un antígeno, es una proteína expresada en la superficie de las células. En algunos casos, el CAR es un CAR similar a un TCR y el antígeno es un antígeno peptídico procesado, tal como un antígeno peptídico de una proteína intracelular, que, como un TCR, se reconoce en la superficie celular en el contexto de una molécula compleja de histocompatibilidad importante (MHC).

[0238] Los receptores de antígenos ejemplares, incluidos los CAR, y los métodos para diseñar e introducir dichos receptores en las células, incluyen los descritos, por ejemplo, en las publicaciones de solicitudes de patente internacionales números WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061. Números de publicación de solicitudes de patente de EE. UU. US2002131960, US2013287748, US20130149337, Patentes de EE. UU. N^{os}: 6,451,995, 7,446,190, 8,252,592, 8,339,645, 8,398,282, 7,446,179, 6,410,319, 7,070,995, 7,265,209, 7,354,762, 7,446,191, 8,324,353 y 8,479,118, y número de solicitud de patente europea EP2537416 y/o los descritos por Sadelain et al, Cancer Discov. 2013 abril; 3(4): 388-398; Dávila et al. (2013) MÁS UNO 8(4): e61338; Turtle y col, Curr. Opinión. Immunol, octubre de 2012; 24(5): 633-39; Wu et al, Cancer, 18 de marzo de 2012 (2): 160-75. En algunos aspectos, los receptores de antígenos incluyen un CAR como se describe en la patente de EE. UU. n^o: 7,446,190 y los descritos en la publicación de solicitud de patente internacional n^o: WO/2014055668 A1. Los ejemplos de CAR incluyen CAR como se describe en cualquiera de las publicaciones antes mencionadas, tales como WO2014031687, US 8,339,645, US 7,446,179, US 2013/0149337, Patente de EE. UU. N^o: 7,446,190, Patente de EE. UU. N^o: 8,389,282, Kochenderfer et al, 2013, Nature Reviews Clinical Oncology, 10, 267-276 (2013); Wang y cols. (2012) J. Immunother. 35(9): 689-701; y Brentjens et al, Sci Transl Med. 2013 5(177). Véase también WO2014031687, US 8,339,645, US 7,446,179, US 2013/0149337, Patente de EE. UU. N.º: 7,446,190 y Patente de EE. UU. N.º: 8,389,282.

[0239] En algunos casos, el CAR se construye con una especificidad por un antígeno particular (o marcador o ligando), tal como un antígeno expresado en un tipo de célula particular al que se dirigirá la terapia adoptiva, por ejemplo, un marcador de cáncer y/o un antígeno destinado a inducir una respuesta amortiguadora, tal como un antígeno expresado en un tipo de célula normal o no enferma. Por tanto, el CAR normalmente incluye en su parte extracelular una o más moléculas de unión a antígeno, tales como uno o más fragmentos, dominios o parte de unión a antígeno, o uno o más dominios variables de anticuerpo y/o moléculas de anticuerpo. En algunos casos, el CAR incluye una parte de unión al antígeno o partes de una molécula de anticuerpo, como un fragmento de anticuerpo monocatenario (scFv) derivado de las cadenas pesada variable (VH) y ligera variable (VL) de un anticuerpo monoclonal (mAb).

[0240] En algunos casos, el anticuerpo o su parte de unión a antígeno se expresa en células como parte de un receptor recombinante, tal como un receptor de antígeno. Entre los receptores de antígenos se encuentran receptores

de antígenos funcionales no TCR, tales como receptores de antígenos quiméricos (CAR). Generalmente, un CAR que contiene un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que exhibe especificidad similar a TCR dirigida contra complejos péptido-MHC también puede denominarse CAR similar a TCR. En algunos casos, el dominio de unión a antígeno extracelular específico para un péptido MHC El complejo de un CAR tipo TCR está unido a uno o más componentes de señalización intracelular, en algunos aspectos a través de conectores y/o dominio(s) transmembrana. En algunos casos, dichas moléculas normalmente pueden imitar o aproximarse a una señal a través de un receptor de antígeno natural, tal como un TCR, y, opcionalmente, una señal a través de dicho receptor en combinación con un receptor coestimulador.

[0241] En algunos casos, el receptor recombinante, tal como un receptor quimérico (por ejemplo, CAR), incluye un dominio de unión a ligando que se une, tal como se une específicamente, a un antígeno (o ligando). Entre los antígenos a los que se dirigen los receptores quiméricos se encuentran aquellos expresados en el contexto de una enfermedad, afección o tipo de célula al que se dirige la terapia celular adoptiva. Entre las enfermedades y afecciones se encuentran enfermedades y trastornos proliferativos, neoplásicos y malignos, incluidos cánceres y tumores, incluidos cánceres hematológicos, cánceres del sistema inmunológico, tales como linfomas, leucemias y/o mielomas, tales como B, T y leucemias mieloides, linfomas y mielomas múltiples.

[0242] En algunos casos, el antígeno (o un ligando) es un polipéptido. En algunos casos, es un carbohidrato u otra molécula. En algunos casos, el antígeno (o un ligando) se expresa o sobreexpresa selectivamente en células de la enfermedad o afección, por ejemplo, el tumor o las células patógenas, en comparación con células o tejidos normales o no diana. En otros casos, el antígeno se expresa en células normales y/o se expresa en células modificadas genéticamente.

[0243] En algunos casos, el CAR contiene un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, scFv) que reconoce específicamente un antígeno, tal como un antígeno intacto, expresado en la superficie de una célula.

[0244] En algunos casos, el antígeno (o un ligando) es un antígeno tumoral o un marcador de cáncer. En algunos casos, el antígeno (o un ligando) es o incluye el receptor de tirosina quinasa huérfano (ROR1), el antígeno de maduración de células B (BCMA), la anhidrasa carbónica 9 (CA9, también conocida como CAIX o G250), Her2/neu (receptor de tirosina quinasa), quinasa erbB2, CD19, CD20, CD22, mesotelina (MSLN), antígeno carcinoembrionario (CEA) y antígeno de superficie de la hepatitis B, receptor antifolato, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, proteoglicano de sulfato de condroitina 4 (CSPG4), EGFR, glicoproteína epitelial 2 (EPG-2), glicoproteína epitelial 40 (EPG-40), receptor de efrina A2 (EPHA2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), dímeros de erbB, crecimiento epidérmico tipo III mutación del receptor del factor (EGFR VIII), proteína de unión a folato (FBP), receptor de Fc tipo 5 (FCRL5, también conocido como homólogo 5 del receptor de Fc o FCRH5), receptor de acetilcolina fetal (AChR fetal), gangliósido GD2, gangliósido GD3, antígeno leucocitario humano A1 (HLA-A1), antígeno leucocitario humano A2 (HLA-A2), receptor alfa de IL-22 (IL-22Ra), receptor de dominio de inserción de quinasa (kdr), cadena ligera kappa, repetición rica en leucina que contiene 8 miembros de la familia A (LRRC8A), Lewis Y, molécula de adhesión de células LI (LI-CAM), antígeno asociado a melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE A6, MAGE-A10, antígeno de melanoma expresado preferentemente (PRAME), survivina, asociado a tumores glicoproteína 72 (TAG72), B7-H3, B7-H6, receptor alfa 2 de IL-13 (IL-13Ra2), antígeno asociado al melanoma de alto peso molecular humano (HMW-MAA), CDI 71, receptor alfa de folato, CD44v7/8, integrina $\alpha\beta 6$ (integrina $\alpha v\beta 6$), 8H9, molécula de adhesión de células neurales (NCAM), receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (receptores VEGF o VEGFR), glicoproteína del trofoblasto (TPBG también conocida como 5T4), ligandos NKG2D, CD44v6, antígeno dual, un antígeno de cáncer de testículo, citomegalovirus murino (CMV), mucina 1 (MUC1), MUC16, antígeno de células madre de próstata (PSCA), antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), ligandos del miembro D del grupo 2 del asesino natural (NKG2D), cáncer/testículo antígeno IB (CTAG, también conocido como NY-ESO-1 y LAGE-2), melan A (MART-1), glicoproteína 100 (gp100), glipican-3 (GPC3), receptor acoplado a proteína G 5D (GPCR5D), antígeno oncofetal, TAG72, proteína relacionada con la tirosinasa 1 (TRP1, también conocida como TYRP1 o gp75), proteína relacionada con la tirosinasa 2 (TRP2, también conocida como dopacromo tautomerasa, dopacromo delta-isomerasa o DCT), receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF R2), antígeno carcinoembrionario (CEA), receptor de estrógeno, receptor de progesterona, un antígeno prostático específico, ephrinB2, CD123, CD133, c-Met, GD2 O-acetilado (OGD2), epítipo CE7 de LI-CAM, tumor de Wilms 1 (WT-1), una ciclina, ciclina A2, ligando de quimiocina con motivo C-C 1 (CCL-1), CD138, un antígeno específico de patógeno o antígeno expresado por patógeno, y un antígeno asociado con una etiqueta universal, y/o moléculas biotiniladas, y/o moléculas expresado por VIH, VHC, VHB u otros patógenos. Los antígenos a los que se dirigen los receptores en algunos casos incluyen antígenos asociados con una enfermedad maligna de células B, tales como cualquiera de varios marcadores de células B conocidos. En algunos casos, el antígeno al que se dirige el receptor es CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Igkappa, Iglambda, CD79a, CD79b o CD30.

[0245] En algunos casos, el antígeno es un antígeno específico de patógeno. En algunos casos, el antígeno es un antígeno viral (tal como un antígeno viral del VIH, VHC, VHB, etc.), antígenos bacterianos y/o antígenos parásitos.

[0246] En algunos casos, el antígeno o el dominio de unión a antígeno es CD19. En algunos casos, el scFv contiene una VH y una VL derivadas de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo específico para CD19. En algunos casos, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a CD19 es un anticuerpo derivado de ratón como FMC63 y

SJ25C1. En algunos casos, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es un anticuerpo humano, por ejemplo, como se describe en la publicación de patente estadounidense n.º US 2016/0152723.

[0247] En algunos casos, el scFv se deriva de FMC63. FMC63 generalmente se refiere a un anticuerpo IgG1 monoclonal de ratón generado contra células Nalm-1 y -16 que expresan CD19 de origen humano (Ling, NR, et al. (1987). Leucocyte typing III. 302). El anticuerpo FMC63 comprende CDRH1 y H2 expuestos en SEQ ID NOS: 38, 39 respectivamente, y CDRH3 expuesto en SEQ ID NOS: 40 o 54 y CDRL1 expuesto en SEQ ID NOS: 35 y secuencias CDR L2 36 o 55 y CDR L3 37 o 34. El anticuerpo FMC63 comprende la región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 y la región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42. En algunos casos, el svFv comprende una cadena ligera variable que contiene la secuencia CDRL1 de SEQ ID NO:35, una secuencia CDRL2 de SEQ ID NO:36 y una secuencia CDRL3 de SEQ ID NO:37 y/o una cadena pesada variable que contiene un CDRL1. secuencia de SEQ ID NO:38, una secuencia CDRH2 de SEQ ID NO:39 y una secuencia CDRH3 de SEQ ID NO:40. En algunos casos, el scFv comprende una región de cadena pesada variable de FMC63 expuesta en SEQ ID NO:41 y una región de cadena ligera variable de FMC63 expuesta en SEQ ID NO:42. En algunos casos, la cadena pesada variable y la cadena ligera variable están conectadas mediante un conector. En algunos casos, el enlazador se establece en SEQ ID NO:56. En algunos casos, el scFv comprende, en orden, una VH, un conector y una VL. En algunos casos, el scFv comprende, en orden, una VL, un conector y una VH. En algunos casos, el svFc está codificado por una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:57 o una secuencia que exhibe al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO:57. En algunos casos, el scFv comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:43 o una secuencia que exhibe al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO:43.

[0248] En algunos casos, el scFv se deriva de SJ25C1. SJ25C1 es un anticuerpo IgG1 monoclonal de ratón generado contra células Nalm-1 y 16 que expresan CD19 de origen humano (Ling, NR, et al. (1987). Leucocitos tipificación 111. 302). El anticuerpo SJ25C1 comprende CDRH1, H2 y H3 expuestos en SEQ ID NOS: 47-49, respectivamente, y secuencias CDRL1, L2 y L3 expuestos en SEQ ID NOS: 44-46, respectivamente. El anticuerpo SJ25C1 comprende la región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50 y la región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51. En algunos casos, el svFv comprende una cadena ligera variable que contiene la secuencia CDRL1 de SEQ ID NO: 44, una secuencia CDRL2 de SEQ ID NO: 45 y una secuencia CDRL3 de SEQ ID NO: 46 y/o una cadena pesada variable que contiene una secuencia CDRL1 de SEQ ID NO: 47, una secuencia CDRH2 de SEQ ID NO:48 y una secuencia CDRH3 de SEQ ID NO:49. En algunos casos, el scFv comprende una región de cadena pesada variable de SJ25C1 expuesta en SEQ ID NO:50 y una región de cadena ligera variable de SJ25C1 expuesta en SEQ ID NO:51. En algunos casos, la cadena pesada variable y la cadena ligera variable están conectadas mediante un conector. En algunos casos, el enlazador se establece en SEQ ID NO:52. En algunos casos, el scFv comprende, en orden, una VH, un conector y una VL. En algunos casos, el scFv comprende, en orden, una VL, un conector y una VH. En algunos casos, el scFv comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:53 o una secuencia que exhibe al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO:53.

[0249] En algunos casos, el antígeno o el dominio de unión a antígeno es BCMA. En algunos casos, el scFv contiene una VH y una VL derivadas de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo específico de BCMA. En algunos casos, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a BCMA es o contiene una VH y una VL de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo establecido en las solicitudes de patente internacionales, número de publicación WO 2016/090327 y WO 2016/090320.

[0250] En algunos casos, el antígeno o el dominio de unión a antígeno es GPRC5D. En algunos casos, el scFv contiene una VH y una VL derivadas de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo específico para GPRC5D. En algunos casos, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a GPRC5D es o contiene una VH y una VL de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo establecido en las solicitudes de patente internacionales, número de publicación WO 2016/090329 y WO 2016/090312.

[0251] En algunos casos, el CAR contiene un anticuerpo similar al TCR, como un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, scFv) que reconoce específicamente un antígeno intracelular, como un antígeno asociado a un tumor, presentado en la superficie celular como un péptido MHC. complejo. En algunos casos, un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo que reconoce un complejo MHC-péptido puede expresarse en células como parte de un receptor recombinante, tal como un receptor de antígeno. Entre los receptores de antígenos se encuentran receptores de antígenos funcionales no TCR, tales como receptores de antígenos quiméricos (CAR). Generalmente, un CAR que contiene un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que exhibe especificidad similar a TCR dirigida contra complejos péptido-MHC también puede denominarse CAR similar a TCR.

[0252] La referencia al "complejo mayor de histocompatibilidad" (MHC) se refiere a una proteína, generalmente una glicoproteína, que contiene un sitio de unión a péptido polimórfico o un surco de unión que puede, en algunos casos, formar complejos con antígenos peptídicos de polipéptidos, incluidos antígenos peptídicos procesados por la

maquinaria celular. En algunos casos, las moléculas de MHC se pueden presentar o expresar en la superficie celular, incluso como un complejo con un péptido, es decir, un complejo MHC-péptido, para la presentación de un antígeno en una conformación reconocible por un receptor de antígeno en las células T, como los TCR o anticuerpo similar a TCR. Generalmente, las moléculas del MHC de clase I son heterodímeros que tienen una membrana que abarca una cadena α , en algunos casos con tres dominios α , y una microglobulina asociada no covalentemente. Generalmente, las moléculas del MHC de clase II están compuestas por dos glicoproteínas transmembrana, α y β , las cuales típicamente atraviesan la membrana. Una molécula de MHC puede incluir una parte eficaz de un MHC que contiene un sitio o sitios de unión a antígeno para unir un péptido y las secuencias necesarias para el reconocimiento por parte del receptor de antígeno apropiado. En algunos casos, las moléculas de MHC de clase I liberan péptidos que se originan en el citosol a la superficie celular, donde las células T, como generalmente las células T CD8+, pero en algunos casos las células T CD4+, reconocen un complejo MHC-péptido. En algunos casos, las moléculas del MHC de clase II liberan péptidos que se originan en el sistema vesicular a la superficie celular, donde normalmente son reconocidos por las células T CD4+. Generalmente, las moléculas de MHC están codificadas por un grupo de loci unidos, que en conjunto se denominan H-2 en el ratón y antígeno leucocitario humano (HLA) en humanos. Por lo tanto, el MHC típicamente humano también puede denominarse antígeno leucocitario humano (HLA).

[0253] El término "complejo MHC-péptido" o "complejo péptido-MHC" o variaciones de los mismos, se refiere a un complejo o asociación de un antígeno peptídico y una molécula de MHC, tal como, generalmente, por interacciones no covalentes del péptido en la unión. Surco o hendidura de la molécula MHC. En algunos casos, el complejo MHC-péptido está presente o se muestra en la superficie de las células. En algunos casos, el complejo MHC-péptido puede ser reconocido específicamente por un receptor de antígeno, tal como un TCR, un CAR tipo TCR o partes de unión a antígeno del mismo.

[0254] En algunos casos, un péptido, tal como un antígeno peptídico o epítipo, de un polipéptido puede asociarse con una molécula de MHC, por ejemplo para el reconocimiento por un receptor de antígeno. Generalmente, el péptido deriva o se basa en un fragmento de una molécula biológica más larga, tal como un polipéptido o una proteína. En algunos casos, el péptido normalmente tiene una longitud de aproximadamente 8 a aproximadamente 24 aminoácidos. En algunos casos, un péptido tiene una longitud de aproximadamente 9 a 22 aminoácidos para su reconocimiento en el complejo MHC de Clase II. En algunos casos, un péptido tiene una longitud de aproximadamente 8 a 13 aminoácidos para su reconocimiento en el complejo MHC de Clase I. En algunos casos, tras el reconocimiento del péptido en el contexto de una molécula MHC, como el complejo peptídico MHC, el receptor de antígeno, como TCR o CAR similar a TCR, produce o desencadena una señal de activación para la célula T que induce una respuesta de células T, tal como proliferación de células T, producción de citoquinas, una respuesta de células T citotóxicas u otra respuesta.

[0255] En algunos casos, se conoce un anticuerpo similar a TCR o una parte de unión a antígeno, o se puede producir mediante métodos conocidos (véanse, por ejemplo, las solicitudes publicadas de EE. UU. N^{os} US2002/0150914; US2003/0223994; US2004/0191260; US2004/0191260; US2006/0034850; US2007/00992530; US20090226474; US20090304679; y publicación internacional PCT n^o WO 03/068201).

[0256] En algunos casos, se puede producir un anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un complejo MHC-péptido inmunizando un huésped con una cantidad eficaz de un inmunógeno que contiene un complejo MHC-péptido específico. En algunos casos, el péptido del complejo MHC-péptido es un epítipo de antígeno capaz de unirse al MHC, tal como un antígeno tumoral, por ejemplo un antígeno tumoral universal, un antígeno de mieloma u otro antígeno como se describe a continuación. En algunos casos, luego se administra una cantidad eficaz del inmunógeno a un huésped para provocar una respuesta inmune, en donde el inmunógeno retiene una forma tridimensional del mismo durante un período de tiempo suficiente para provocar una respuesta inmune contra la presentación tridimensional del péptido en el surco de unión de la molécula MHC. A continuación, se analiza el suero recogido del huésped para determinar si se están produciendo los anticuerpos deseados que reconozcan una presentación tridimensional del péptido en el surco de unión de la molécula de MHC. En algunos casos, los anticuerpos producidos pueden evaluarse para confirmar que el anticuerpo puede diferenciar el complejo MHC-péptido de la molécula de MHC sola, el péptido de interés solo y un complejo de MHC y péptido irrelevante. A continuación se pueden aislar los anticuerpos deseados.

[0257] En algunos casos, se puede producir un anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un complejo MHC-péptido empleando métodos de presentación de bibliotecas de anticuerpos, tales como bibliotecas de anticuerpos en fagos. En algunos casos, se pueden generar bibliotecas de presentación en fagos de Fab, scFv u otras formas de anticuerpos mutantes, por ejemplo, en las que los miembros de la biblioteca están mutados en uno o más residuos de una CDR o CDR. Véase, por ejemplo, la solicitud publicada en EE. UU. n^o US20020150914, US2014/0294841; y Cohen CJ. et al. (2003) J Mol. Recogn. 16:324-332.

[0258] El término "anticuerpo" en el presente documento se utiliza en el sentido más amplio e incluye anticuerpos policlonales y monoclonales, incluidos anticuerpos intactos y fragmentos de anticuerpos funcionales (de unión a antígeno), incluidos fragmentos de unión a antígeno (Fab), fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fab', fragmentos Fv, fragmentos de IgG recombinante (rIgG), regiones de cadena pesada variable (VH) capaces de unirse específicamente al antígeno, fragmentos de anticuerpos de cadena sencilla, incluidos fragmentos variables de cadena sencilla (scFv), y anticuerpos de dominio único (por ejemplo, sdAb, sdFv, nanocuerpo). El término abarca formas genéticamente

modificadas y/o modificadas de otro modo de inmunoglobulinas, tales como intracuerpos, peptidocuerpos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos completamente humanos, anticuerpos humanizados y anticuerpos heteroconjugados, multiespecíficos, por ejemplo, biespecíficos, anticuerpos, diacuerpos, tricuerpos y tetracuerpos, en tándem. di-scFv, tri-scFv en tándem. A menos que se indique lo contrario, debe entenderse que el término “anticuerpo” abarca fragmentos de anticuerpos funcionales del mismo. El término también abarca anticuerpos intactos o de longitud completa, incluidos anticuerpos de cualquier clase o subclase, incluidas IgG y sus subclases, IgM, IgE, IgA e IgD.

[0259] En algunos casos, las proteínas de unión a antígeno, los anticuerpos y sus fragmentos de unión a antígeno reconocen específicamente un antígeno de un anticuerpo de longitud completa. En algunos casos, las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo pueden ser de longitud completa o pueden ser una cadena de unión a antígeno (un Fab, F(ab')₂, Fv o un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv)). En otros casos, la región constante de la cadena pesada del anticuerpo se elige entre, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD e IgE, particularmente seleccionada entre, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. más particularmente, IgG1 (por ejemplo, IgG1 humana). En otro caso, la región constante de la cadena ligera del anticuerpo se elige entre, por ejemplo, kappa o lambda, particularmente kappa.

[0260] Entre los anticuerpos divulgados se encuentran fragmentos de anticuerpos. Un “fragmento de anticuerpo” se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una parte de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, entre otros, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diacuerpos; anticuerpos lineales; regiones de cadena pesada variable (VH), moléculas de anticuerpos de cadena sencilla tales como scFv y anticuerpos únicos VH de dominio único; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. En casos particulares, los anticuerpos son fragmentos de anticuerpos monocatenarios que comprenden una región de cadena pesada variable y/o una región de cadena ligera variable, tales como scFv.

[0261] El término “región variable” o “dominio variable” se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de un anticuerpo que participa en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo nativo generalmente tienen estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones estructurales conservadas (FR) y tres CDR. (Véase, por ejemplo, Kindt et al. Kuby Immunology, 6ª ed, WH Freeman and Co, página 91 (2007). Un único dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión al antígeno. Además, los anticuerpos que se unen a un Se puede aislar un antígeno particular usando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para seleccionar una biblioteca de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Véase, por ejemplo, Portolano et al, J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson y otros, Nature 352:624-628 (1991).

[0262] Los anticuerpos de dominio único son fragmentos de anticuerpos que comprenden todo o una parte del dominio variable de cadena pesada o todo o una parte del dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo. En ciertos casos, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo de dominio único humano. En algunos casos, el CAR comprende un dominio de cadena pesada de anticuerpo que se une específicamente al antígeno, tal como un marcador de cáncer o antígeno de superficie celular de una célula o enfermedad a la que se va a dirigir, tal como una célula tumoral o una célula cancerosa, tal como cualquiera de los antígenos diana descritos en el presente documento o conocidos en la técnica.

[0263] Los fragmentos de anticuerpos se pueden preparar mediante diversas técnicas, que incluyen, entre otras, la digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como la producción mediante células huésped recombinantes. En algunos casos, los anticuerpos son fragmentos producidos de forma recombinante, tales como fragmentos que comprenden disposiciones que no se producen naturalmente, tales como aquellos con dos o más regiones o cadenas de anticuerpos unidas por conectores sintéticos, por ejemplo, conectores peptídicos, y/o que pueden no puede producirse mediante digestión enzimática de un anticuerpo intacto de origen natural. En algunos casos, los fragmentos de anticuerpos son scFv.

[0264] Un anticuerpo “humanizado” es un anticuerpo en el que todos o sustancialmente todos los residuos de aminoácidos de CDR se derivan de CDR no humanas y todos o sustancialmente todos los residuos de aminoácidos de FR se derivan de FR humanas. Un anticuerpo humanizado puede incluir opcionalmente al menos una parte de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una “forma humanizada” de un anticuerpo no humano se refiere a una variante del anticuerpo no humano que se ha humanizado, normalmente para reducir la inmunogenicidad en humanos, conservando al mismo tiempo la especificidad y afinidad del anticuerpo no humano original. En algunos casos, algunos residuos de FR en un anticuerpo humanizado se sustituyen con residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que se derivan los residuos de CDR), por ejemplo, para restablecer o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

[0265] Por tanto, en algunos casos, el receptor de antígeno quimérico, incluidos los CAR de tipo TCR, incluye una parte extracelular que contiene un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. En algunos casos, el anticuerpo o fragmento incluye un scFv. En algunos aspectos, el receptor de antígeno quimérico incluye una parte extracelular que contiene el anticuerpo o fragmento y una región de señalización intracelular. En algunos casos, la región de señalización intracelular comprende un dominio de señalización intracelular. En algunos casos, el dominio de señalización

intracelular es o comprende un dominio de señalización primario, un dominio de señalización que es capaz de inducir una señal de activación primaria en una célula T, un dominio de señalización de un componente del receptor de células T (TCR) y/o un dominio de señalización que comprende un motivo de activación basado en tirosina de inmunorreceptor (ITAM).

[0266] En algunos casos, el receptor recombinante tal como el CAR, tal como el anticuerpo parte del mismo, incluye además un espaciador, que puede ser o incluir al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina o variante o versión modificada de la misma, tal como una región bisagra, por ejemplo, una región bisagra de IgG4 y/o una región C_H1/C_L y/o F_c. En algunos casos, el receptor recombinante comprende además un espaciador y/o una región bisagra. En algunos casos, la región constante o parte es de una IgG humana, tal como IgG4 o IgG1. En algunos aspectos, la parte de la región constante sirve como región espaciadora entre el componente de reconocimiento de antígeno, por ejemplo, scFv, y el dominio transmembrana. El espaciador puede tener una longitud que proporcione una mayor capacidad de respuesta de la célula después de la unión al antígeno, en comparación con la ausencia del espaciador. En algunos ejemplos, el espaciador tiene una longitud de 12 aminoácidos o aproximadamente o no tiene más de 12 aminoácidos de longitud. Los espaciadores ejemplares incluyen aquellos que tienen al menos aproximadamente 10 a 229 aminoácidos, aproximadamente 10 a 200 aminoácidos, aproximadamente 10 a 175 aminoácidos, aproximadamente 10 a 150 aminoácidos, aproximadamente 10 a 125 aminoácidos, aproximadamente 10 a 100 aminoácidos, aproximadamente 10 a 75 aminoácidos, aproximadamente 10 a 50 aminoácidos, aproximadamente 10 a 40 aminoácidos, aproximadamente 10 a 30 aminoácidos, aproximadamente 10 a 20 aminoácidos, o aproximadamente 10 a 15 aminoácidos, e incluyendo cualquier número entero entre los puntos finales de cualquiera de los rangos enumerados. En algunos casos, una región espaciadora tiene aproximadamente 12 aminoácidos o menos, aproximadamente 119 aminoácidos o menos, o aproximadamente 229 aminoácidos o menos. Los espaciadores ejemplares incluyen bisagra de IgG4 sola, bisagra de IgG4 unida a los dominios CH2 y CH3, o bisagra de IgG4 unida al dominio CH3. Los espaciadores ejemplares incluyen, entre otros, los descritos en Hudecek et al. (2013) Clin. Cancer Res, 19:3153 o número de publicación de solicitud de patente internacional WO2014031687. En algunos casos, el espaciador tiene la secuencia establecida en SEQ ID NO:1, y está codificado por la secuencia establecida en SEQ ID NO: 2. En algunos casos, el espaciador tiene la secuencia establecida en SEQ ID NO: 3 En algunos casos, el espaciador tiene la secuencia establecida en SEQ ID NO: 4.

[0267] En algunos casos, la región constante o parte es de IgD. En algunos casos, el espaciador tiene la secuencia establecida en SEQ ID NO: 5. En algunos casos, el espaciador tiene una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NOS: 1, 3, 4 y 5. En algunos casos, el espaciador tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NOS: 23-31. En algunos casos, el espaciador tiene una secuencia de aminoácidos que presenta al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NOS: 23-31.

[0268] En algunos casos, el receptor de antígeno comprende un dominio intracelular unido directa o indirectamente al dominio extracelular. En algunos casos, el receptor de antígeno quimérico incluye un dominio transmembrana que une el dominio extracelular y el dominio de señalización intracelular. En algunos casos, el dominio de señalización intracelular comprende un ITAM. Por ejemplo, en algunos aspectos, el dominio de reconocimiento de antígeno (por ejemplo, dominio extracelular) está unido a uno o más componentes de señalización intracelular, tales como componentes de señalización que imitan la activación a través de un complejo receptor de antígeno, tal como un complejo TCR, en el caso de un CAR y/o señal a través de otros dominios receptores de la superficie celular. En algunos casos, el receptor quimérico comprende un dominio transmembrana unido o fusionado entre el dominio extracelular (por ejemplo, scFv) y el dominio de señalización intracelular. Así, en algunos casos, el componente de unión al antígeno (por ejemplo, anticuerpo) está unido a una o más regiones de señalización transmembrana e intracelular. En algunos casos, el dominio transmembrana está fusionado con el dominio extracelular. En un caso, se usa un dominio transmembrana que está asociado naturalmente con uno de los dominios en el receptor, por ejemplo, CAR. En algunos casos, el dominio transmembrana se selecciona o modifica mediante sustitución de aminoácidos para evitar la unión de dichos dominios a los dominios transmembrana de proteínas de membrana de superficie iguales o diferentes para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor.

[0269] El dominio transmembrana en algunos casos deriva de una fuente natural o sintética. Cuando la fuente es natural, el dominio en algunos aspectos se deriva de cualquier proteína transmembrana o unida a membrana. Las regiones transmembrana incluyen aquellas derivadas de (es decir, comprenden al menos la(s) región(es) transmembrana de) la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD 16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. Alternativamente, el dominio transmembrana en algunos casos es sintético. En algunos aspectos, el dominio transmembrana sintético comprende residuos predominantemente hidrófobos tales como leucina y valina. En algunos aspectos, se encontrará un triplete de fenilalanina, triptófano y valina en cada extremo de un dominio transmembrana sintético. En algunos casos, el enlace se realiza mediante enlazadores, espaciadores y/o dominio(s) transmembrana. En algunos aspectos, el dominio transmembrana contiene una parte transmembrana de CD28.

[0270] En algunos casos, el dominio extracelular y el dominio transmembrana pueden estar unidos directa o indirectamente. En algunos casos, el dominio extracelular y la transmembrana están unidos mediante un espaciador,

como cualquiera de los descritos en el presente documento. En algunos casos, el receptor contiene una parte extracelular de la molécula de la que se deriva el dominio transmembrana, como una parte extracelular CD28.

[0271] Entre los dominios de señalización intracelular se encuentran aquellos que imitan o se aproximan a una señal a través de un receptor de antígeno natural, una señal a través de dicho receptor en combinación con un receptor coestimulador y/o una señal a través de un receptor coestimulador solo. En algunos casos, está presente un conector oligo o polipeptídico corto, por ejemplo, un conector de entre 2 y 10 aminoácidos de longitud, tal como uno que contiene glicinas y serinas, por ejemplo, doblete glicina-serina, y forma un enlace entre el dominio transmembrana y el dominio de señalización citoplasmática del CAR.

[0272] El receptor, por ejemplo el CAR, generalmente incluye al menos uno o varios componentes de señalización intracelular. En algunos casos, el receptor incluye un componente intracelular de un complejo de TCR, tal como una cadena CD3 de TCR que media la activación y citotoxicidad de las células T, por ejemplo, la cadena zeta de CD3. Por tanto, en algunos aspectos, el anticuerpo de unión a ROR1 está unido a uno o más módulos de señalización celular. En algunos casos, los módulos de señalización celular incluyen dominio transmembrana de CD3, dominios de señalización intracelular de CD3 y/u otros dominios transmembrana de CD. En algunos casos, el receptor, por ejemplo CAR, incluye además una parte de una o más moléculas adicionales tales como receptor γ de F_c , CD8, CD4, CD25 o CD16. Por ejemplo, en algunos aspectos, el CAR incluye una molécula quimérica entre CD3-zeta (CD3- ζ) o receptor γ de F_c y CD8, CD4, CD25 o CD16.

[0273] En algunos casos, tras la ligación del CAR, el dominio citoplasmático o el dominio de señalización intracelular del receptor activa al menos una de las funciones o respuestas efectoras normales de la célula inmunitaria, por ejemplo, células T diseñadas para expresar el CAR. Por ejemplo, en algunos contextos, el CAR induce una función de una célula T, como la actividad citolítica o la actividad T auxiliar, como la secreción de citoquinas u otros factores. En algunos casos, se usa una parte truncada de una región de señalización intracelular de un componente receptor de antígeno o molécula coestimuladora en lugar de una cadena inmunoestimuladora intacta, por ejemplo, si transduce la señal de la función efectora. En algunos casos, el dominio o dominios de señalización intracelular incluyen las secuencias citoplasmáticas del receptor de células T (TCR), y en algunos aspectos también las de los co-receptores que en el contexto natural actúan en concierto con dicho receptor para iniciar la transducción de señales después del acoplamiento del receptor de antígeno, y/o cualquier derivado o variante de dichas moléculas, y/o cualquier secuencia sintética que tenga la misma capacidad funcional.

[0274] En el contexto de un TCR natural, la activación completa generalmente requiere no sólo señalización a través del TCR, sino también una señal coestimuladora. Por lo tanto, en algunos casos, para promover la activación completa, también se incluye en el CAR un componente para generar una señal secundaria o coestimuladora. En otros casos, el CAR no incluye un componente para generar una señal coestimuladora. En algunos aspectos, un CAR adicional se expresa en la misma célula y proporciona el componente para generar la señal secundaria o coestimuladora.

[0275] En algunos aspectos, la activación de las células T se describe como mediada por dos clases de secuencias de señalización citoplasmáticas: aquellas que inician la activación primaria dependiente de antígeno a través del TCR (secuencias de señalización citoplasmáticas primarias) y aquellas que actúan de manera independiente del antígeno para proporcionar una activación secundaria o señal coestimuladora (secuencias de señalización citoplasmática secundaria). En algunos aspectos, el CAR incluye uno o ambos de tales componentes de señalización.

[0276] En algunos aspectos, el CAR incluye una secuencia de señalización citoplasmática primaria que regula la activación primaria del complejo TCR. Las secuencias de señalización citoplasmáticas primarias que actúan de manera estimuladora pueden contener motivos de señalización que se conocen como motivos de activación basados en tirosina de inmunorreceptores o ITAM. Los ejemplos de ITAM que contienen secuencias de señalización citoplasmáticas primarias incluyen aquellas derivadas de TCR o CD3 zeta, FcR gamma o FcR beta. En algunos casos, las moléculas de señalización citoplasmática en el CAR contienen un dominio de señalización citoplasmática, una parte del mismo o una secuencia derivada de CD3 zeta.

[0277] En algunos casos, el CAR incluye una región de señalización y/o una parte transmembrana de un receptor coestimulador, como CD28, 4-1BB, OX40, DAP10 e ICOS. En algunos aspectos, un mismo CAR incluye tanto la región de señalización como componentes coestimuladores. En algunos casos, el receptor de antígeno quimérico contiene un dominio intracelular derivado de una molécula coestimuladora de células T o una variante funcional de la misma, tal como entre el dominio transmembrana y el dominio de señalización intracelular. En algunos aspectos, la molécula coestimuladora de células T es CD28 o 41BB.

[0278] En algunos casos, la región de señalización y/o el dominio activador se incluyen dentro de un CAR, mientras que el componente coestimulador lo proporciona otro CAR que reconoce otro antígeno. En algunos casos, los CAR incluyen CAR activadores o estimuladores y CAR coestimuladores, ambos expresados en la misma célula (consulte el documento WO2014/055668). En algunos aspectos, las células incluyen uno o más CAR estimuladores o activadores y/o un CAR coestimulador. En algunos casos, las células incluyen además CAR inhibidores (iCAR, véase Fedorov et al, Sci. Transl. Medicine, 5(215) (diciembre de 2013), como un CAR que reconoce un antígeno distinto del asociado con y/o específico para la enfermedad o afección mediante la cual una señal de activación suministrada a

través del CAR dirigido a la enfermedad se reduce o inhibe mediante la unión del CAR inhibidor a su ligando, por ejemplo, para reducir los efectos fuera del objetivo.

[0279] En ciertos casos, el dominio de señalización intracelular comprende una transmembrana CD28 y un dominio de señalización unido a un dominio intracelular CD3 (por ejemplo, CD3-zeta). En algunos casos, el dominio de señalización intracelular comprende dominios coestimuladores CD28 y CD137 (4-1BB, TNFRSF9) quiméricos, unidos a un dominio intracelular CD3 zeta.

[0280] En algunos casos, el CAR abarca uno o más, por ejemplo, dos o más, dominios coestimuladores y un dominio de activación, por ejemplo, un dominio de activación primario, en la parte citoplasmática. Los CAR ejemplares incluyen componentes intracelulares de CD3-zeta, CD28 y 4-1BB.

[0281] En algunos casos, el receptor de antígeno incluye además un marcador y/o células que expresan el CAR u otro receptor de antígeno incluye además un marcador sustituto, tal como un marcador de superficie celular, que puede usarse para confirmar la transducción o ingeniería de la célula para expresar el receptor. En algunos aspectos, el marcador incluye todo o parte (por ejemplo, forma truncada) de CD34, un NGFR o receptor del factor de crecimiento epidérmico, tal como una versión truncada de tal receptor de superficie celular (por ejemplo, tEGFR). Los marcadores sustitutos ejemplares pueden incluir formas truncadas de polipéptidos de la superficie celular, tales como formas truncadas que no son funcionales y no transducen o no son capaces de transducir una señal o una señal normalmente transducida por la forma de longitud completa del polipéptido de la superficie celular, y/o no somos o no somos capaces de internalizar. Polipéptidos de superficie celular truncados ejemplares que incluyen formas truncadas de factores de crecimiento u otros receptores tales como un receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano truncado (tHER2), un receptor del factor de crecimiento epidérmico truncado (tEGFR, secuencia de tEGFR ejemplar expuesta en SEQ ID NO: 7 o 16) o un antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) o una forma modificada del mismo. tEGFR puede contener un epítipo reconocido por el anticuerpo cetuximab (Erbix®) u otro anticuerpo terapéutico anti EGFR o molécula de unión, que puede usarse para identificar o seleccionar células que han sido diseñadas con la construcción tEGFR y una proteína exógena codificada, y/o para eliminar o separar células que expresan la proteína exógena codificada. Véase la patente de EE. UU. n° 8.802.374 y Liu et al, Nature Biotech. 2016 abril; 34(4): 430-434). En algunos aspectos, el marcador, por ejemplo, marcador sustituto, incluye todo o parte (por ejemplo, forma truncada) de CD34, un NGFR, un CD19 o un CD19 truncado, por ejemplo, un CD19 no humano truncado, o un receptor del factor de crecimiento epidérmico (por ejemplo, tEGFR). En algunos casos, el marcador es o comprende una proteína fluorescente, tal como proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente verde mejorada (EGFP), tal como GFP súper plegada (sfGFP), proteína fluorescente roja (RFP), tal como tdTomato, mCherry, mStrawberry, AsRed2, DsRed o DsRed2, proteína fluorescente cian (CFP), proteína fluorescente verde azul (BFP), proteína fluorescente azul mejorada (EBFP) y proteína fluorescente amarilla (YFP), y variantes de las mismas, incluidas variantes de especies, variantes monoméricas y variantes optimizadas con codones y/o mejoradas de las proteínas fluorescentes. En algunos casos, el marcador es o comprende una enzima, tal como una luciferasa, el gen lacZ de E. coli, fosfatasa alcalina, fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP), cloranfenicol acetil transferasa (CAT). Los genes indicadores emisores de luz a modo de ejemplo incluyen luciferasa (luc), β -galactosidasa, cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), β -glucuronidasa (GUS) o variantes de los mismos.

[0282] En algunos casos, el marcador es un marcador de selección. En algunos casos, el marcador de selección es o comprende un polipéptido que confiere resistencia a agentes o fármacos exógenos. En algunos casos, el marcador de selección es un gen de resistencia a los antibióticos. En algunos casos, el marcador de selección es un gen de resistencia a los antibióticos que confiere resistencia a los antibióticos a una célula de mamífero. En algunos casos, el marcador de selección es o comprende un gen de resistencia a puomicina, un gen de resistencia a higromicina, un gen de resistencia a blasticidina, un gen de resistencia a neomicina, un gen de resistencia a geneticina o un gen de resistencia a zeocina o una forma modificada del mismo.

[0283] En algunos casos, el ácido nucleico que codifica el marcador está unido operativamente a un polinucleótido que codifica una secuencia conectora, tal como una secuencia conectora escindible, por ejemplo, una T2A. Por ejemplo, un marcador, y opcionalmente una secuencia conectora, puede ser cualquiera de los descritos en la Pub. PCT. N° WO2014031687. Por ejemplo, el marcador puede ser un EGFR truncado (tEGFR) que está, opcionalmente, unido a una secuencia conectora, tal como una secuencia conectora escindible T2A. Un polipéptido ejemplar para un EGFR truncado (por ejemplo, tEGFR) comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7 o 16 o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con SEQ ID NO: 7 o 16.

[0284] En algunos casos, el ácido nucleico que codifica el marcador está unido operativamente a un polinucleótido que codifica una secuencia conectora, tal como una secuencia conectora escindible, por ejemplo, una secuencia conectora escindible de MMP. Por ejemplo, un marcador, y opcionalmente una secuencia conectora, puede ser cualquiera de los descritos en la solicitud de patente publicada n° WO2014031687. Por ejemplo, el marcador puede ser un EGFR truncado (tEGFR) que está, opcionalmente, unido a una secuencia conectora, tal como una secuencia conectora escindible T2A.

[0285] En algunos casos, el marcador es una molécula, por ejemplo, una proteína de la superficie celular, que no se encuentra de forma natural en las células T o que no se encuentra de forma natural en la superficie de las células T, o una parte de las mismas. En algunos casos, la molécula es una molécula no propia, por ejemplo, una proteína no propia, es decir, una que no es reconocida como "propia" por el sistema inmunológico del huésped al que se transferirán adoptivamente las células.

[0286] En algunos casos, el marcador no cumple ninguna función terapéutica y/o no produce ningún efecto distinto del de usarse como marcador para ingeniería genética, por ejemplo, para seleccionar células diseñadas con éxito. En otros casos, el marcador puede ser una molécula terapéutica o una molécula que de otro modo ejerza algún efecto deseado, tal como un ligando para una célula que se encontrará in vivo, tal como una molécula coestimuladora o de punto de control inmunológico para mejorar y/o mitigar las respuestas de la célula células tras la transferencia adoptiva y el encuentro con el ligando.

[0287] En algunos casos, los CAR se denominan CAR de primera, segunda y/o tercera generación. En algunos aspectos, un CAR de primera generación es aquel que únicamente proporciona una señal inducida por la cadena CD3 tras la unión al antígeno; en algunos aspectos, un CAR de segunda generación es uno que proporciona tal señal y señal coestimuladora, tal como una que incluye un dominio de señalización intracelular de un receptor coestimulador tal como CD28 o CD137; en algunos aspectos, un CAR de tercera generación en algunos aspectos es uno que incluye múltiples dominios coestimuladores de diferentes receptores coestimuladores.

[0288] En algunos casos, el receptor de antígeno quimérico incluye una parte extracelular que contiene el anticuerpo o fragmento descrito en el presente documento. En algunos aspectos, el receptor de antígeno quimérico incluye una parte extracelular que contiene el anticuerpo o fragmento descrito en el presente documento y un dominio de señalización intracelular. En algunos casos, el anticuerpo o fragmento incluye un scFv o un anticuerpo VH de dominio único y el dominio intracelular contiene un ITAM. En algunos aspectos, el dominio de señalización intracelular incluye un dominio de señalización de una cadena zeta de una cadena CD3-zeta (CD3). En algunos casos, el receptor de antígeno quimérico incluye un dominio transmembrana dispuesto entre el dominio extracelular y la región de señalización intracelular.

[0289] En algunos aspectos, el dominio transmembrana contiene una parte transmembrana de CD28. El dominio extracelular y el transmembrana pueden estar unidos directa o indirectamente. En algunos casos, el dominio extracelular y la transmembrana están unidos mediante un espaciador, como cualquiera de los descritos en el presente documento. En algunos casos, el receptor de antígeno quimérico contiene un dominio intracelular de una molécula coestimuladora de células T, tal como entre el dominio transmembrana y el dominio de señalización intracelular. En algunos aspectos, la molécula coestimuladora de células T es CD28 o 4-1BB.

[0290] En algunos casos, el CAR contiene un anticuerpo, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo, un dominio transmembrana que es o contiene una parte transmembrana de CD28 o una variante funcional del mismo, y un dominio de señalización intracelular que contiene una parte de señalización de CD28 o una variante funcional del mismo y una puerta de señalización de CD3 zeta o una variante funcional del mismo. En algunos casos, el CAR contiene un anticuerpo, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo, un dominio transmembrana que es o contiene una parte transmembrana de CD28 o una variante funcional del mismo, y un dominio de señalización intracelular que contiene una parte de señalización de 4-1BB o una variante funcional del mismo y una parte de señalización de CD3 zeta o una variante funcional del mismo. En algunos de tales casos, el receptor incluye además un espaciador que contiene una parte de una molécula de Ig, tal como una molécula de Ig humana, tal como una bisagra de Ig, por ejemplo, una bisagra de IgG4, tal como un espaciador de sólo bisagra.

[0291] En algunos casos, el dominio transmembrana del receptor, por ejemplo, el CAR es un dominio transmembrana de CD28 humano o una variante del mismo, por ejemplo, un dominio transmembrana de 27 aminoácidos de un CD28 humano (Nº de registro: P10747.1), o es un dominio transmembrana que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 8 o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con SEQ ID NO:8; en algunos casos, el dominio transmembrana que contiene parte del receptor recombinante comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 9 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos o aproximadamente 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con la misma.

[0292] En algunos casos, el receptor de antígeno quimérico contiene un dominio intracelular de una molécula coestimuladora de células T. En algunos aspectos, la molécula coestimuladora de células T es CD28 o 4-1BB.

[0293] En algunos casos, la región de señalización intracelular comprende un dominio de señalización coestimulador intracelular de CD28 humano o variante funcional o parte del mismo, tal como un dominio de 41 aminoácidos del mismo y/o dicho dominio con una sustitución de LL por GG en las posiciones 186-187 de una proteína CD28 nativa. En algunos casos, el dominio de señalización intracelular puede comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 10 u 11 o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con SEQ ID NO: 10 u 11. En

algunos casos, la región intracelular comprende un dominio de señalización coestimulador intracelular de 4-1BB o variante funcional o parte del mismo, tal como un dominio citoplasmático de 42 aminoácidos de un 4-1BB humano (n.º de registro Q07011.1) o variante funcional o parte del mismo, tal como la secuencia de aminoácidos establecidos en SEQ ID NO: 12 o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con SEQ ID NO: 12.

[0294] En algunos casos, la región de señalización intracelular comprende una cadena CD3 humana, opcionalmente un dominio de señalización estimulador de CD3 zeta o una variante funcional del mismo, tal como un dominio citoplasmático de 112 AA de la isoforma 3 de CD3ζ humano (n.º de registro: P20963.2) o una señalización de dominio CD3 zeta como se describe en la Patente de EE. UU. N.º 7.446.190 o la Patente de EE. UU. N.º 8.911.993. En algunos casos, la región de señalización intracelular comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 13, 14 o 15 o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con SEQ ID NO: 13, 14 o 15.

[0295] En algunos aspectos, el espaciador contiene solo una región bisagra de una IgG, tal como solo una bisagra de IgG4 o IgG1, tal como el espaciador solo bisagra expuesto en SEQ ID NO: 1. En otros casos, el espaciador es una bisagra de Ig, por ejemplo, una bisagra de IgG4, unida a dominios CH2 y/o CH3. En algunos casos, el espaciador es una bisagra de Ig, por ejemplo, una bisagra de IgG4, unida a los dominios CH2 y CH3, tal como se establece en SEQ ID NO:3. En algunos casos, el espaciador es una bisagra de Ig, por ejemplo, una bisagra de IgG4, unida únicamente a un dominio CH3, tal como se establece en SEQ ID NO:4. En algunos casos, el espaciador es o comprende una secuencia rica en glicina-serina u otro conector flexible tal como los conectores flexibles conocidos.

[0296] Por ejemplo, en algunos casos, el CAR incluye un anticuerpo tal como un fragmento de anticuerpo, que incluye scFv, un espaciador, tal como un espaciador que contiene una parte de una molécula de inmunoglobulina, tal como una región bisagra y/o una o más regiones constantes de una molécula de cadena pesada, tal como un espaciador que contiene bisagra de Ig, un dominio transmembrana que contiene todo o una parte de un dominio transmembrana derivado de CD28, un dominio de señalización intracelular derivado de CD28 y un dominio de señalización zeta de CD3. En algunos casos, el CAR incluye un anticuerpo o fragmento, tal como scFv, un espaciador tal como cualquiera de los espaciadores que contienen bisagras de Ig, un dominio transmembrana derivado de CD28, un dominio de señalización intracelular derivado de 4-1BB y un dominio de señalización derivado de CD3 zeta.

[0297] En algunos casos, las moléculas de ácido nucleico que codifican dichas construcciones de CAR incluyen además una secuencia que codifica un elemento de salto ribosómico T2A y/o una secuencia tEGFR, por ejemplo, cadena abajo de la secuencia que codifica el CAR. En algunos casos, la secuencia codifica un elemento de salto ribosomal T2A establecido en SEQ ID NO: 6 o 17, o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6 o 17. En algunos casos, las células T que expresan un receptor de antígeno (por ejemplo, CAR) también se puede generar para expresar un EGFR truncado (EGFRt) como un epítipo de selección no inmunogénico (por ejemplo, mediante la introducción de una construcción que codifica CAR y EGFRt separados por un interruptor de ribosoma T2A para expresar dos proteínas de la misma construcción), que luego puede usarse como marcador para detectar dichas células (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 8.802.374). En algunos casos, la secuencia codifica una secuencia tEGFR expuesta en SEQ ID NO: 7 o 16, o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con SEQ ID NO: 7 o 16. En algunos casos, el péptido, tal como T2A, puede causar el ribosoma se salta (salto de ribosoma) la síntesis de un enlace peptídico en el extremo C de un elemento 2A, lo que lleva a la separación entre el final de la secuencia 2A y el siguiente péptido aguas abajo (véase, por ejemplo, de Felipe. Genetic Vaccines and Ther. 2:13 (2004) y de Felipe et al. Traffic 5:616-626 (2004)). Se conocen muchos elementos 2A. Ejemplos de secuencias 2A que se pueden usar en los métodos y ácidos nucleicos divulgados en el presente documento, sin limitación, secuencias 2A del virus de la fiebre aftosa (F2A, por ejemplo, SEQ ID NO: 22), virus de la rinitis equina A (E2A, por ejemplo, SEQ ID NO: 21), virus Thessea asigna (T2A, por ejemplo, SEQ ID NO: 6 o 17), y teschovirus-1 porcino (P2A, por ejemplo, SEQ ID NO: 19 o 20) como se describe en la publicación de patente de EE. UU. N.º 20070116690.

[0298] Los receptores recombinantes, tales como CAR, expresados por las células administradas al sujeto generalmente reconocen o se unen específicamente a una molécula que se expresa, está asociada con y/o es específica para la enfermedad o afección o las células de la misma que se están tratando. Tras la unión específica a la molécula, por ejemplo, antígeno, el receptor generalmente suministra una señal inmunoestimuladora, tal como una señal transducida por ITAM, al interior de la célula, promoviendo así una respuesta inmune dirigida a la enfermedad o afección. Por ejemplo, en algunos casos, las células expresan un CAR que se une específicamente a un antígeno expresado por una célula o tejido de la enfermedad o afección o asociado con la enfermedad o afección.

b. Receptores quiméricos de autoanticuerpos (CAAR)

[0299] En algunos casos, entre el receptor recombinante expresado por las células diseñadas utilizadas en relación con los métodos, usos, artículos de fabricación y composiciones divulgados se encuentra un receptor de autoanticuerpo quimérico (CAAR). En algunos casos, el CAAR es específico de un autoanticuerpo. En algunos casos,

se puede usar una célula que expresa CAAR, tal como una célula T diseñada para expresar un CAAR, para unirse específicamente y matar células que expresan autoanticuerpos, pero no células que expresan anticuerpos normales. En algunos casos, las células que expresan CAAR se pueden usar para tratar una enfermedad autoinmune asociada con la expresión de autoantígenos, tal como enfermedades autoinmunes. En algunos casos, las células que expresan CAAR pueden apuntar a las células B que en última instancia producen los autoanticuerpos y muestran los autoanticuerpos en sus superficies celulares, marcando estas células B como objetivos específicos de la enfermedad para la intervención terapéutica. En algunos casos, las células que expresan CAAR se pueden usar para atacar y matar eficazmente las células B patógenas en enfermedades autoinmunes atacando las células B que causan la enfermedad usando un receptor de autoanticuerpo quimérico específico de antígeno. En algunos casos, el receptor recombinante es un CAAR, tal como cualquiera descrito en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. N° 2017/0051035.

[0300] En algunos casos, el CAAR comprende un dominio de unión a autoanticuerpo, un dominio transmembrana y una región de señalización intracelular. En algunos casos, la región de señalización intracelular comprende un dominio de señalización intracelular. En algunos casos, el dominio de señalización intracelular es o comprende un dominio de señalización primario, un dominio de señalización que es capaz de inducir una señal de activación primaria en una célula T, un dominio de señalización de un componente del receptor de células T (TCR) y/o un dominio de señalización que comprende un motivo de activación basado en tirosina de inmunorreceptor (ITAM). En algunos casos, la región de señalización intracelular comprende una región de señalización secundaria o coestimuladora (regiones de señalización intracelular secundarias).

[0301] En algunos casos, el dominio de unión al autoanticuerpo comprende un autoantígeno o un fragmento del mismo. La elección del autoantígeno puede depender del tipo de autoanticuerpo al que se dirige. Por ejemplo, el autoantígeno puede elegirse porque reconoce un autoanticuerpo en una célula diana, tal como una célula B, asociada con un estado patológico particular, por ejemplo, una enfermedad autoinmune, tal como una enfermedad autoinmune mediada por autoanticuerpos. En algunos casos, la enfermedad autoinmune incluye pénfigo vulgar (PV). Los autoantígenos ejemplares incluyen desmogleína 1 (Dsg1) y Dsg3.

c. Orientación múltiple

[0302] En algunos casos, las células utilizadas en relación con los métodos, usos, artículos de fabricación y composiciones divulgados incluyen células que emplean estrategias de múltiples objetivos. En algunos casos, las células expresan múltiples cadenas (CAR) o expresan dos o más receptores genéticamente modificados en la célula, cada uno de los cuales reconoce un antígeno diferente y normalmente cada uno incluye un componente de señalización intracelular diferente. Dichas estrategias de focalización múltiple se describen, por ejemplo, en la Solicitud de Patente Internacional, Publicación N°: WO 2014055668 A1 (que describe combinaciones de CAR activadores y coestimuladores, por ejemplo, apuntando a dos antígenos diferentes presentes individualmente en células fuera del objetivo, por ejemplo, células normales, pero presentes juntos sólo en células de la enfermedad o condición a tratar) y Fedorov et al, Sci. Transl. Medicine, 5(215) (2013) (que describe células que expresan un CAR activador y uno inhibidor, como aquellas en las que el CAR activador se une a un antígeno expresado tanto en células normales o no enfermas como en células de la enfermedad o afección que se va a tratar, y el CAR inhibidor se une a otro antígeno expresado sólo en las células normales o en las células que no se desea tratar).

[0303] Por ejemplo, en algunos casos, las células incluyen un receptor que expresa un primer receptor de antígeno diseñado genéticamente (por ejemplo, CAR o TCR) que es capaz de inducir una señal de activación o estimulación a la célula, generalmente tras la unión específica al antígeno reconocido por la célula. primer receptor, por ejemplo, el primer antígeno. En algunos casos, la célula incluye además un segundo receptor de antígeno diseñado genéticamente (por ejemplo, CAR o TCR), por ejemplo, un receptor coestimulador quimérico, que es capaz de inducir una señal coestimuladora a la célula inmunitaria, generalmente tras la unión específica a un segundo antígeno reconocido por el segundo receptor. En algunos casos, el primer antígeno y el segundo antígeno son iguales. En algunos casos, el primer antígeno y el segundo antígeno son diferentes.

[0304] En algunos casos, el primer y/o segundo receptor de antígeno diseñado genéticamente (por ejemplo, CAR o TCR) es capaz de inducir una señal de activación a la célula. En algunos casos, el receptor incluye un componente de señalización intracelular que contiene motivos ITAM o similares a ITAM. En algunos casos, la activación inducida por el primer receptor implica una transducción de señales o un cambio en la expresión de proteínas en la célula que da como resultado el inicio de una respuesta inmune, tal como la fosforilación de ITAM y/o el inicio de una cascada de transducción de señales mediada por ITAM, la formación de un sistema inmunológico. sinapsis y/o agrupamiento de moléculas cerca del receptor unido (por ejemplo, CD4 o CD8, etc.), activación de uno o más factores de transcripción, como NF-KB y/o AP-1, y/o inducción de la expresión génica de factores como citocinas, proliferación y/o supervivencia.

[0305] En algunos casos, el primer y/o segundo receptor incluyen dominios o regiones de señalización intracelular de receptores coestimuladores tales como CD28, CD137 (4-1BB), OX40 y/o ICOS. En algunos casos, el primer y segundo receptor incluyen un dominio de señalización intracelular de un receptor coestimulador que son diferentes. En un caso, el primer receptor contiene una región de señalización coestimuladora CD28 y el segundo receptor contiene una región de señalización coestimuladora 4-1BB. reg10n o viceversa.

[0306] En algunos casos, el primer y/o segundo receptor incluyen tanto un dominio de señalización intracelular que contiene ITAM o motivos similares a ITAM como un dominio de señalización intracelular de un receptor coestimulador.

[0307] En algunos casos, el primer receptor contiene un dominio de señalización intracelular que contiene ITAM o motivos similares a ITAM y el segundo receptor contiene un dominio de señalización intracelular de un receptor coestimulador. La señal coestimuladora en combinación con la señal activadora inducida en la misma célula es aquella que da como resultado una respuesta inmune, tal como una respuesta inmune robusta y sostenida, tal como aumento de la expresión génica, secreción de citocinas y otros factores, y funciones de efector mediado por células T como la destrucción celular.

[0308] En algunos casos, ni la ligadura del primer receptor sola ni la ligadura del segundo receptor sola inducen una respuesta inmune sólida. En algunos aspectos, si sólo se liga un receptor, la célula se vuelve tolerante o no responde al antígeno, o se inhibe, y/o no se induce a proliferar o secretar factores o llevar a cabo funciones efectoras. Sin embargo, en algunos de estos casos, cuando se ligan la pluralidad de receptores, como por ejemplo tras el encuentro de una célula que expresa el primer y segundo antígenos, se logra una respuesta deseada, tal como activación o estimulación inmune completa, por ejemplo, como lo indica la secreción de una o más citoquinas, proliferación, persistencia y/o realización de una función efectora inmune tal como destrucción citotóxica de una célula diana.

[0309] En algunos casos, los dos receptores inducen, respectivamente, una señal activadora y otra inhibidora a la célula, de modo que la unión de uno de los receptores a su antígeno activa la célula o induce una respuesta, pero la unión del segundo receptor inhibidor a su antígeno induce una señal que suprime o amortigua esa respuesta. Algunos ejemplos son combinaciones de CAR activadores y CAR inhibidores o iCAR. Se puede usar una estrategia de este tipo, por ejemplo, en la que el CAR activador se une a un antígeno expresado en una enfermedad o afección pero que también se expresa en células normales, y el receptor inhibidor se une a un antígeno separado que se expresa en las células normales pero no células de la enfermedad o condición.

[0310] En algunos casos, la estrategia de focalización múltiple se emplea en un caso en el que un antígeno asociado con una enfermedad o afección particular se expresa en una célula no enferma y/o se expresa en la propia célula modificada, ya sea de forma transitoria (por ejemplo, tras estimulación en asociación con la ingeniería genética) o de forma permanente. En tales casos, al requerir la ligación de dos receptores de antígenos separados e individualmente específicos, se puede mejorar la especificidad, selectividad y/o eficacia.

[0311] En algunos casos, la pluralidad de antígenos, por ejemplo, el primer y segundo antígeno, se expresan en la célula, tejido o enfermedad o afección a la que se dirige, tal como en la célula cancerosa. En algunos aspectos, la célula, tejido, enfermedad o afección es mieloma múltiple o una célula de mieloma múltiple. En algunos casos, uno o más de la pluralidad de antígenos generalmente también se expresan en una célula a la que no se desea dirigir la terapia celular, tal como una célula o tejido normal o no enfermo, y/o las propias células modificadas genéticamente. En tales casos, al requerir la ligadura de múltiples receptores para lograr una respuesta de la célula, se logra especificidad y/o eficacia.

d. Receptores de células T (TCR)

[0312] En algunos casos, se describen células diseñadas, tales como células T, que expresan un receptor de células T (TCR) o un receptor de unión a antígeno del mismo que reconoce un epítipo peptídico o un epítipo de células T de un polipéptido diana, tal como un antígeno de un tumor, proteína viral o autoinmune.

[0313] En algunos casos, un "receptor de células T" o "TCR" es una molécula que contiene cadenas α y β variables (también conocidas como TCR α y TCR β , respectivamente) o cadenas γ y δ variables (también conocidas como TCR γ y TCR δ , respectivamente) o partes de unión a antígeno del mismo, y que es capaz de unirse específicamente a un péptido unido a una molécula de MHC. En algunos casos, el TCR tiene el formato $\alpha\beta$. Normalmente, los TCR que existen en las formas $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ son generalmente estructuralmente similares, pero las células T que los expresan pueden tener ubicaciones o funciones anatómicas distintas. Un TCR se puede encontrar en la superficie de una célula o en forma soluble. Generalmente, un TCR se encuentra en la superficie de las células T (o linfocitos T), donde generalmente es responsable de reconocer los antígenos unidos a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).

[0314] A menos que se indique lo contrario, debe entenderse que el término "TCR" abarca TCR completos así como partes de unión a antígeno o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. En algunos casos, el TCR es un TCR intacto o completo, incluidos los TCR en forma $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$. En algunos casos, el TCR es una parte de unión a antígeno que es menor que un TCR de longitud completa pero que se une a un péptido específico unido a una molécula de MHC, tal como se une a un complejo MHC-péptido. En algunos casos, una parte o fragmento de un TCR de unión a antígeno puede contener sólo una parte de los dominios estructurales de un TCR de longitud completa o intacto, pero aun así es capaz de unirse al epítipo peptídico, tal como el complejo MHC-péptido, a al que se une el TCR completo. En algunos casos, una parte de unión a antígeno contiene los dominios variables de un TCR, tales como una cadena α variable y una cadena β variable de un TCR, suficientes para formar un sitio de unión para la unión a un complejo

peptídico MHC específico. Generalmente, las cadenas variables de un TCR contienen regiones determinantes de complementariedad implicadas en el reconocimiento del péptido, MHC y/o complejo MHC-péptido.

[0315] En algunos casos, los dominios variables del TCR contienen bucles hipervariables o regiones determinantes de la complementariedad (CDR), que generalmente son los principales contribuyentes al reconocimiento del antígeno y a las capacidades y especificidad de unión. En algunos casos, una CDR de un TCR o una combinación de los mismos forma todo o sustancialmente todo el sitio de unión al antígeno de una molécula de TCR determinada. Las diversas CDR dentro de una región variable de una cadena de TCR generalmente están separadas por regiones estructurales (FR), que generalmente muestran menos variabilidad entre las moléculas de TCR en comparación con las CDR (véase, por ejemplo, Jores et al, Proc. Nat'l Acad Sci. USA 87:9138, 1990; Chothia et al, EMBO J. 7:3745, 1988; véase también Lefranc et al, Dev. Comp. Immunol. 27:55, 2003). En algunos casos, CDR3 es la principal CDR responsable de la unión o especificidad del antígeno, o es la más importante entre las tres CDR en una región variable de TCR determinada para el reconocimiento de antígeno y/o para la interacción con el péptido procesado del complejo de péptido-MHC. En algunos contextos, la CDR1 de la cadena alfa puede interactuar con la parte N-terminal de ciertos péptidos antígenicos. En algunos contextos, la CDR1 de la cadena beta puede interactuar con la parte C terminal del péptido. En algunos contextos, CDR2 contribuye más fuertemente o es la CDR principal responsable de la interacción o el reconocimiento de la parte MHC del complejo MHC-péptido. En algunos casos, la región variable de la cadena β puede contener una región hipervariable adicional (CDR4 o HVR4), que generalmente está implicada en la unión del superantígeno y no en el reconocimiento del antígeno (Kotb (1995) Clinical Microbiology Reviews, 8:411-426).

[0316] En algunos casos, un TCR también puede contener un dominio constante, un dominio transmembrana y/o una cola citoplasmática corta (véase, por ejemplo, Janeway et al, Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 3ª edición, Current Biology Publications), pág. 4:33, 1997). En algunos aspectos, cada cadena del TCR puede poseer un dominio variable de inmunoglobulina N-terminal, un dominio constante de inmunoglobulina, una región transmembrana y una cola citoplasmática corta en el extremo C-terminal. En algunos casos, un TCR está asociado con proteínas invariantes del complejo CD3 implicadas en la mediación de la transducción de señales.

[0317] En algunos casos, una cadena TCR contiene uno o más dominios constantes. Por ejemplo, la parte extracelular de una cadena de TCR dada (por ejemplo, cadena α o cadena β) puede contener dos dominios similares a inmunoglobulinas, tales como un dominio variable (por ejemplo, V α o V β ; normalmente los aminoácidos 1 a 116 basados en Kabat numeración Kabat et al, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Institutos Nacionales de Salud del Servicio de Salud Pública, 1991, 5ª ed.) y un dominio constante (por ejemplo, dominio constante de cadena α o C α , típicamente (posiciones 117 a 259 de la cadena basada en la numeración de Kabat o dominio constante de cadena β o C β , típicamente posiciones 117 a 295 de la cadena basada en Kabat) adyacentes a la membrana celular. Por ejemplo, en algunos casos, la parte extracelular del TCR formado por las dos cadenas contiene dos dominios constantes proximales a la membrana y dos dominios variables distales a la membrana, cuyos dominios variables contienen cada uno CDR. El dominio constante del TCR puede contener secuencias de conexión cortas en las que un residuo de cisteína forma un enlace disulfuro, uniendo así las dos cadenas del TCR. En algunos casos, un TCR puede tener un residuo de cisteína adicional en cada una de las cadenas α y β , de modo que el TCR contenga dos enlaces disulfuro en los dominios constantes.

[0318] En algunos casos, las cadenas de TCR contienen un dominio transmembrana. En algunos casos, el dominio transmembrana está cargado positivamente. En algunos casos, la cadena TCR contiene una cola citoplasmática. En algunos casos, la estructura permite que el TCR se asocie con otras moléculas como CD3 y subunidades del mismo. Por ejemplo, un TCR que contiene dominios constantes con una región transmembrana puede anclar la proteína en la membrana celular y asociarse con subunidades invariantes del complejo o aparato de señalización CD3. Las colas intracelulares de las subunidades de señalización de CD3 (p. ej, cadenas CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ y CD3 ζ) contienen uno o más motivos de activación basados en tirosina de inmunorreceptores o 1TAM que están implicados en la capacidad de señalización del complejo TCR.

[0319] En algunos casos, el TCR puede ser un heterodímero de dos cadenas α y β (u opcionalmente γ y δ) o puede ser una construcción de TCR de cadena única. En algunos casos, el TCR es un heterodímero que contiene dos cadenas separadas (cadenas α y β o cadenas γ y δ) que están unidas, como por un enlace disulfuro o enlaces disulfuro.

[0320] En algunos casos, el TCR puede generarse a partir de una secuencia o secuencias de TCR conocidas, tales como secuencias de cadenas V α , β , para las cuales está fácilmente disponible una secuencia codificante de longitud sustancialmente completa. Son bien conocidos los métodos para obtener secuencias de TCR de longitud completa, incluidas secuencias de la cadena V, a partir de fuentes celulares. En algunos casos, los ácidos nucleicos que codifican el TCR se pueden obtener de una variedad de fuentes, tales como mediante la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los ácidos nucleicos que codifican el TCR dentro o aislados de una célula o células determinadas, o la síntesis de secuencias ADN de TCR disponibles públicamente.

[0321] En algunos casos, el TCR se obtiene de una fuente biológica, tal como de células tales como de una célula T (por ejemplo, célula T citotóxica), hibridomas de células T u otra fuente disponible públicamente. En algunos casos, las células T pueden obtenerse a partir de células aisladas in vivo. En algunos casos, el TCR es un TCR seleccionado térmicamente. En algunos casos, el TCR es un TCR restringido a neoepítipo. En algunos casos, las células T pueden

ser un híbrido o un clon de células T cultivadas. En algunos casos, el TCR o su parte de unión a antígeno o su fragmento de unión a antígeno se pueden generar sintéticamente a partir del conocimiento de la secuencia del TCR.

[0322] En algunos casos, el TCR se genera a partir de un TCR identificado o seleccionado a partir del cribado de una biblioteca de TCR candidatos frente a un antígeno polipeptídico diana, o un epítipo de célula T diana del mismo. Las bibliotecas de TCR pueden generarse mediante amplificación del repertorio de V α y V β de células T aisladas de un sujeto, incluidas células presentes en PBMC, bazo u otro órgano linfóide. En algunos casos, las células T pueden amplificarse a partir de linfocitos infiltrantes de células (TIL). En algunos casos, se pueden generar bibliotecas de TCR a partir de células T CD4+ o CD8+. En algunos casos, los TCR se pueden amplificar a partir de una fuente de células T de un sujeto normal o sano, es decir, bibliotecas de TCR normales. En algunos casos, los TCR se pueden amplificar a partir de una fuente de células T de un sujeto enfermo, es decir, bibliotecas de TCR enfermos. En algunos casos, se utilizan principios degenerados para amplificar el repertorio de genes de V α y V β , por ejemplo mediante RT-PCR en muestras, como células T, obtenidas de humanos. En algunos casos, las bibliotecas scTv se pueden ensamblar a partir de bibliotecas V α y V β originales en las que los productos amplificados se clonan o se ensamblan para separarlos mediante un conector. Dependiendo de la fuente del sujeto y de las células, las bibliotecas pueden ser específicas del alelo HLA. Alternativamente, en algunos casos, las bibliotecas de TCR pueden generarse mediante mutagénesis o diversificación de una molécula de TCR original o de estructura. En algunos aspectos, los TCR están sujetos a evolución dirigida, tal como por mutagénesis, por ejemplo, de la cadena α o β . En algunos aspectos, se alteran residuos particulares dentro de las CDR del TCR. En algunos casos, los TCR seleccionados pueden modificarse mediante naturalización por afinidad. En algunos casos, se pueden seleccionar células T específicas de antígeno, por ejemplo mediante cribado para evaluar la actividad de CTL contra el péptido. En algunos aspectos, los TCR, por ejemplo presentes en las células T específicas de antígeno, pueden seleccionarse, por ejemplo mediante actividad de unión, por ejemplo, afinidad o avidez particular por el antígeno.

[0323] En algunos casos, el TCR o su parte de unión a antígeno es uno que ha sido modificado o diseñado. En algunos casos, se utilizan métodos de evolución dirigida para generar TCR con propiedades alteradas, como por ejemplo con mayor afinidad por un complejo MHC-péptido específico. En algunos casos, la evolución dirigida se logra mediante métodos de presentación que incluyen, entre otros, presentación en levadura (Holler et al. (2003) Nat Immunol, 4, 55-62; Holler et al. (2000) Proc Natl Acad Sci EE. UU., 97, 5387-92), presentación en fagos (Li et al. (2005) Nat Biotechnol, 23, 349-54), o presentación en células T (Chervin et al. (2008) J Immunol Methods, 339, 175-84). En algunos casos, los enfoques de visualización implican diseñar o modificar un TCR conocido, principal o de referencia. Por ejemplo, en algunos casos, se puede usar un TCR de tipo salvaje como plantilla para producir TCR mutagenizados en los que uno o más residuos de las CDR están mutados, y mutantes con una propiedad alterada deseada, tal como una mayor afinidad por un antígeno diana deseado, se seleccionan.

[0324] En algunos casos, los péptidos de un polipéptido diana para su uso en la producción o generación de un TCR de interés son conocidos o pueden identificarse fácilmente. En algunos casos, los péptidos adecuados para su uso en la generación de TCR o partes de unión a antígeno se pueden determinar basándose en la presencia de un motivo restringido por HLA en un polipéptido diana de interés, tal como un polipéptido diana descrito a continuación. En algunos casos, los péptidos se identifican utilizando modelos de predicción por computadora disponibles. En algunos casos, para predecir los sitios de unión del MHC clase I, tales modelos incluyen, entre otros, ProPred1 (Singh y Raghava (2001) Bioinformatics 17(12):1236-1237, y SYFPEITHI (véase Schuler et al. (2007) Immunoinformatics Methods in Molecular Biology, 409(1): 75-93 2007). En algunos casos, el epítipo restringido al MHC es HLA-A0201, que se expresa en aproximadamente el 39-46 % de todos los caucásicos y, por lo tanto, representa una adecuada elección del antígeno MHC para su uso en la preparación de un TCR u otra molécula de unión a péptido MHC.

[0325] Se conocen los motivos de unión a HLA-A0201 y los sitios de escisión para proteosomas y proteosomas inmunes utilizando modelos de predicción por computadora. Para predecir los sitios de unión del MHC de clase I, dichos modelos incluyen, entre otros, ProPred1 (descrito con más detalle en Singh y Raghava, ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. BIOINFORMATICS 17(12):1236-1237 2001). y SYFPEITHI (véase Schuler et al. SYFPEITHI, Base de datos para la búsqueda y predicción de epítopos de células T. en Immunoinformatics Methods in Molecular Biology, vol 409(1): 75-93 2007)

[0326] En algunos casos, el TCR o su parte de unión a antígeno puede ser una proteína natural producida de forma recombinante o una forma mutada de la misma en la que una o más propiedades, tales como la característica de unión, se han alterado. En algunos casos, un TCR puede derivar de una de varias especies animales, tales como humanos, ratones, ratas u otros mamíferos. Un TCR puede estar unido a células o en forma soluble. En algunos casos, para los fines de los métodos descritos, el TCR está en forma unida a células expresada en la superficie de una célula.

[0327] En algunos casos, el TCR es un TCR completo. En algunos casos, el TCR es una parte de unión a antígeno. En algunos casos, el TCR es un TCR dimérico (dTCR). En algunos casos, el TCR es un TCR de cadena única (scTCR). En algunos casos, un dTCR o scTCR tiene las estructuras descritas en los documentos WO 03/020763, WO 04/033685, WO 2011/044186.

[0328] En algunos casos, el TCR contiene una secuencia correspondiente a la secuencia transmembrana. En algunos casos, el TCR contiene una secuencia correspondiente a secuencias citoplasmáticas. En algunos casos, el

TCR es capaz de formar un complejo de TCR con CD3. En algunos casos, cualquiera de los TCR, incluido un dTCR o scTCR, puede unirse a dominios de señalización que producen un TCR activo en la superficie de una célula T. En algunos casos, el TCR se expresa en la superficie de las células.

[0329] En algunos casos, un dTCR contiene un primer polipéptido en el que una secuencia correspondiente a un TCR, una secuencia de región variable de cadena, está fusionada al extremo N de una secuencia correspondiente a un TCR, una secuencia extracelular de región constante de cadena, y un segundo polipéptido en el que una secuencia correspondiente a se fusiona una secuencia de región variable de cadena de TCR al extremo N de una secuencia correspondiente a una secuencia extracelular de región constante de cadena de TCR, estando unidos el primer y segundo polipéptidos mediante un enlace disulfuro. En algunos casos, el enlace puede corresponder al enlace disulfuro entre cadenas nativo presente en los TCR a diméricos nativos. En algunos casos, los enlaces disulfuro entre cadenas no están presentes en un TCR nativo. Por ejemplo, en algunos casos, se pueden incorporar una o más cisteínas en las secuencias extracelulares de la región constante del par de polipéptidos dTCR. En algunos casos, puede ser deseable un enlace disulfuro tanto nativo como no nativo. En algunos casos, el TCR contiene una secuencia transmembrana para anclarse a la membrana.

[0330] En algunos casos, un dTCR contiene una cadena de TCR que contiene un dominio a variable, un dominio a constante y un primer motivo de dimerización unido al extremo C del dominio a constante, y una cadena de TCR que comprende un dominio variable, un dominio constante y un primer motivo de dimerización unido al extremo C del dominio constante, en el que el primer y segundo motivo de dimerización interactúan fácilmente para formar un enlace covalente entre un aminoácido en el primer motivo de dimerización y un aminoácido en el segundo motivo de dimerización que une una cadena TCR α y una cadena TCR β juntas.

[0331] En algunos casos, el TCR es un scTCR. Normalmente, se puede generar un scTCR utilizando métodos conocidos. Véase, por ejemplo, Soo Hoo, W. F. et al. PNAS (EE. UU.) 89, 4759 (1992); Wülfing, C. y Plückerthun, A., J. Mol. Biol. 242, 655 (1994); Kurucz, I. et al. PNAS (EE. UU.) 90 3830 (1993); PCT publicadas internacionalmente N^{os} WO 96/13593, WO 96/18105, WO99/60120, WO99/18129, WO 03/020763, WO2011/044186; y Schlueter, CJ et al. J. Mol. Biol. 256, 859 (1996). En algunos casos, un scTCR contiene un enlace entre cadenas disulfuro no nativo introducido para facilitar la asociación de las cadenas de TCR (véase, por ejemplo, la PCT publicada internacionalmente n^o WO 03/020763). En algunos casos, un scTCR es un TCR truncado sin enlaces disulfuro en el que cremalleras de leucina heterólogas fusionadas a sus extremos C-terminales facilitan la asociación de cadenas (véase, por ejemplo, la publicación internacional PCT n^o WO99/60120). En algunos casos, un scTCR contiene un dominio variable de TCR α unido covalentemente a un dominio variable de TCR mediante un conector peptídico (véase, por ejemplo, la publicación internacional PCT n^o WO99/18129).

[0332] En algunos casos, un scTCR contiene un primer segmento constituido por una secuencia de aminoácidos correspondiente a una región variable de cadena de TCR, un segundo segmento constituido por una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia de región variable de cadena de TCR fusionada al extremo N de un aminoácido. secuencia ácida correspondiente a una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena TCR, y una secuencia conectora que une el extremo C del primer segmento al extremo N del segundo segmento.

[0333] En algunos casos, un scTCR contiene un primer segmento constituido por una secuencia de región variable de cadena fusionada al extremo N de una secuencia de dominio constante extracelular de cadena α , y un segundo segmento constituido por una secuencia de región variable de cadena β fusionada al extremo N de una secuencia constante extracelular de cadena β y secuencia transmembrana, y, opcionalmente, una secuencia conectora que une el extremo C del primer segmento al extremo N del segundo segmento.

[0334] En algunos casos, un scTCR contiene un primer segmento constituido por una secuencia de región variable de cadena de TCR fusionada al extremo N de una secuencia de dominio constante extracelular de cadena, y un segundo segmento constituido por una secuencia de región variable de cadena α fusionada al extremo N de una constante extracelular de cadena α de secuencia y una secuencia transmembrana, y, opcionalmente, una secuencia conectora que une el extremo C del primer segmento al extremo N del segundo segmento.

[0335] En algunos casos, el conector de un scTCR que une el primer y segundo segmento de TCR puede ser cualquier conector capaz de formar una única cadena polipeptídica, conservando al mismo tiempo la especificidad de unión al TCR. En algunos casos, la secuencia conectora puede, por ejemplo, tener la fórmula -P-AA-P- en la que P es prolina y AA representan una secuencia de aminoácidos en la que los aminoácidos son glicina y serina. En algunos casos, el primer y segundo segmento están emparejados de modo que las secuencias de la región variable de los mismos estén orientadas para dicha unión. Por lo tanto, en algunos casos, el conector tiene una longitud suficiente para abarcar la distancia entre el extremo C del primer segmento y el extremo N del segundo segmento, o viceversa, pero no es demasiado largo para bloquear o reducir la unión del scTCR al ligando objetivo. En algunos casos, el conector puede contener de o aproximadamente de 10 a 45 aminoácidos, tales como de 10 a 30 aminoácidos o de 26 a 41 residuos de aminoácidos, por ejemplo 29, 30, 31 o 32 aminoácidos. En algunos casos, el conector tiene la fórmula -PGGG-(SGGGG)5-P- en la que P es prolina, G es glicina y S es serina (SEQ ID NO:32). En algunos casos, el enlazador tiene la secuencia GSADDAKKDAKKDGKS (SEQ ID NO:33).

[0336] En algunos casos, el scTCR contiene un enlace disulfuro covalente que une un residuo de la región de inmunoglobulina del dominio constante de la cadena α a un residuo de la región de inmunoglobulina del dominio constante de la cadena. En algunos casos, el enlace disulfuro entre cadenas en un TCR nativo no está presente. Por ejemplo, en algunos casos, se pueden incorporar una o más cisteínas en las secuencias extracelulares de la región constante del primer y segundo segmento del polipéptido scTCR. En algunos casos, puede ser deseable un enlace disulfuro tanto nativo como no nativo.

[0337] En algunos casos de un dTCR o scTCR que contiene enlaces disulfuro entre cadenas introducidos, los enlaces disulfuro nativos no están presentes. En algunos casos, una o más de las cisteínas nativas que forman enlaces disulfuro intercatenarios nativos se sustituyen por otro residuo, tal como por una serina o alanina. En algunos casos, se puede formar un enlace disulfuro introducido mutando residuos distintos de cisteína en el primer y segundo segmento a cisteína. En la PCT internacional publicada nº WO2006/000830 se describen ejemplos de enlaces disulfuro no nativos de un TCR.

[0338] En algunos casos, el TCR o su fragmento de unión a antígeno muestra una afinidad con una constante de unión en equilibrio para un antígeno diana de entre o entre aproximadamente 10^{-5} y 10^{-12} M y todos los valores e intervalos individuales del mismo. En algunos casos, el antígeno diana es un complejo o ligando MHC-péptido.

[0339] En algunos casos, el ácido nucleico o los ácidos nucleicos que codifican un TCR, tal como las cadenas α y β , pueden amplificarse mediante PCR, clonación u otros medios adecuados y clonarse en un vector o vectores de expresión adecuados. El vector de expresión puede ser cualquier vector de expresión recombinante adecuado y puede usarse para transformar o transfectar cualquier huésped adecuado. Los vectores adecuados incluyen aquellos diseñados para propagación y expansión o para expresión o ambas, tales como plásmidos y virus.

[0340] En algunos casos, el vector puede ser un vector de la serie pUC (Fermentas Life Sciences), la serie pBluescript (Stratagene, LaJolla, California), la serie pET (Novagen, Madison, Wisconsin), la serie pGEX (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia), o la serie pEX (Clontech, Palo Alto, California). En algunos casos, también se pueden utilizar vectores bacteriófagos, tales como λ G10, λ G11, λ ZapII (Stratagene), λ EMBL4 y λ NM1149. En algunos casos, se pueden usar vectores de expresión de plantas e incluyen pBI01, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 y pBIN19 (Clontech). En algunos casos, los vectores de expresión animales incluyen pEUK-CI, pMAM y pMAMneo (Clontech). En algunos casos, se utiliza un vector viral, tal como un vector retroviral.

[0341] En algunos casos, los vectores de expresión recombinantes se pueden preparar usando técnicas de ADN recombinante estándar. En algunos casos, los vectores pueden contener secuencias reguladoras, tales como codones de iniciación y terminación de la transcripción y traducción, que son específicos del tipo de huésped (por ejemplo, bacteria, hongo, planta o animal) en el que se va a introducir el vector, como apropiado y teniendo en cuenta si el vector está basado en ADN o ARN. En algunos casos, el vector puede contener un promotor no nativo unido operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica el TCR o la parte de unión al antígeno (u otra molécula de unión al péptido MHC). En algunos casos, el promotor puede ser un promotor no viral o un promotor viral, tal como un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor SV40, un promotor RSV y un promotor que se encuentra en la repetición terminal larga del virus de la célula madre murina. También se contemplan otros promotores conocidos.

[0342] En algunos casos, para generar un vector que codifica un TCR, las cadenas α y β se amplifican por PCR a partir de ADNc total aislado de un clon de células T que expresa el TCR de interés y se clonan en un vector de expresión. En algunos casos, las cadenas α y β se clonan en el mismo vector. En algunos casos, las cadenas α y β se clonan en vectores diferentes. En algunos casos, las cadenas α y β generadas se incorporan a un vector retroviral, por ejemplo lentiviral.

D. Características de la composición de la célula de salida

[0343] En casos particulares, los métodos descritos en el presente documento producen o generan una composición de células que contienen células modificadas genéticamente, por ejemplo, una composición de células resultantes. En ciertos casos, una composición de células de salida es una composición de células que resulta de algunos o todos los pasos para la ingeniería genética de células. En ciertos casos, la composición de células de salida resulta de un proceso de ingeniería genética de células de una composición de células de entrada. En ciertos casos, el proceso contiene uno o más pasos para activar, transducir o transfectar, expandir y/o recolectar células, tales como células que se obtuvieron a partir de una composición de células de entrada. En ciertos casos, la composición de células resultante contiene células que han sido modificadas genéticamente. En casos particulares, las células de la composición de células de salida han pasado por todos los pasos de un proceso de ingeniería genética.

[0344] En algunos casos, la composición de células resultante contiene células que incluyen uno o más ácidos nucleicos introducidos mediante ingeniería genética y, por lo tanto, expresan productos recombinantes o genéticamente modificados de dichos ácidos nucleicos. En algunos casos, los ácidos nucleicos son heterólogos, es decir, normalmente no están presentes en una célula o muestra obtenida de la célula, tal como una obtenida de otro organismo o célula, que por ejemplo, normalmente no se encuentra en la célula que se está diseñando y/o o un organismo del que deriva dicha célula. En algunos casos, los ácidos nucleicos no se producen de forma natural, tal

como un ácido nucleico que no se encuentra en la naturaleza, incluido uno que comprende combinaciones quiméricas de ácidos nucleicos que codifican varios dominios de múltiples tipos de células diferentes.

[0345] En algunos casos, la composición de células resultante contiene células que han sido modificadas genéticamente. En casos particulares, la composición de células de salida contiene células T modificadas genéticamente. En algunos casos, las células T modificadas incluyen células T CD4+ modificadas y células T CD8+ modificadas. En casos particulares, la composición de la célula de salida contiene o incluye al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,9 %, o 100 % o alrededor del 100 % de células T diseñadas. En ciertos casos, las células diseñadas expresan un receptor recombinante. En casos particulares, la composición de la célula de salida contiene o incluye al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, al menos 99,9 %, o 100 % o alrededor del 100 % de células T que expresan un receptor recombinante. En algunos casos, el receptor recombinante es un TCR o un CAR. En casos particulares, el receptor recombinante es un CAR.

[0346] En ciertos casos, la composición de células de salida tiene una proporción de células T CD4+ modificadas genéticamente a células T CD8+ de entre 5:1 y 0,2:1, entre 4:1 y 0,25:1, entre 3:1 y 0,33:1, entre 2:1 a 0,5:1, entre 1,5:1 a 0,66:1, o entre 1,25:1 a 0,8:1. En casos particulares, la composición de células de salida tiene una proporción de células T CD4+ modificadas genéticamente a células T CD8+ de entre 2:1 y 0,5:1. En algunos casos, la composición de células de salida tiene una proporción de células T CD4+ modificadas genéticamente a células T CD8+ de o aproximadamente 2,0:1, 1,9:1, 1,8:1, 1,7:1, 1,6:1, 1,5:1, 1,4:1, 1,3:1, 1,2:1, 1,1:1, 1,0:1, 0,9:1, 0,8:1, 0,7:1, 0,6:1 o 0,5:1. En casos particulares, la composición de células de salida tiene una proporción de células T CD4+ modificadas genéticamente a células T CD8+ de o de aproximadamente 1:1. En casos particulares, las células T modificadas genéticamente expresan un receptor recombinante. En casos particulares, la composición de células de salida tiene una relación entre células T CD4+ que expresan receptores recombinantes y células T CD8+ que expresan receptores recombinantes de o de aproximadamente 2,0:1, 1,9:1, 1,8:1, 1,7:1, 1,6:1, 1,5:1, 1,4:1, 1,3:1, 1,2:1, 1,1:1, 1,0:1, 0,9:1, 0,8:1, 0,7:1, 0,6:1 o 0,5:1. En casos particulares, la composición de células de salida tiene una proporción de células T CD4+ que expresan receptores recombinantes y células T CD8+ que expresan receptores recombinantes de o de aproximadamente 1:1. En algunos casos, el receptor recombinante es un TCR o un CAR. En casos particulares, el receptor recombinante es un CAR.

[0347] En algunos casos, los métodos dan como resultado una composición de células de salida que tiene una proporción de células T CD4+ modificadas genéticamente con respecto a células T CD8+ modificadas genéticamente, una proporción de células T CD4+ que expresan un receptor recombinante con respecto a células T CD8+ que expresan un receptor recombinante, y/o una proporción de una proporción de células T CD4+ que expresan un CAR a células T CD8+ que expresan un CAR que está dentro de una cierta diferencia tolerada o rango de error de tal proporción definida, deseada o fija, y/o da como resultado tal proporción en un cierto porcentaje del tiempo que se realiza el método, tal como al menos o aproximadamente el 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o más de 95 % del tiempo. En algunos casos, la diferencia tolerada está dentro de aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, o aproximadamente 75 % de la relación. En algunos aspectos, la proporción está dentro del 10 %, 20 % o 30 % de la proporción deseada y/o está dentro de esa proporción al menos el 70 %, 80 % o el 90 % del tiempo que se realizan los métodos. En ciertos casos, la proporción está dentro del 50 % de una proporción de 1:1 al menos el 90 % del tiempo que se realizan los métodos.

[0348] En algunos casos, la diferencia tolerada y/o la proporción definida de células T CD4+ a CD8+ que expresan receptores recombinantes y/o que expresan CAR se determinan o se han determinado mediante la administración de diferentes tipos de células, tales como la administración de células T CD4+ y CD8+, a uno o más sujetos en una pluralidad de proporciones o números de prueba, y evaluar uno o más parámetros. En algunos aspectos, la determinación de la proporción definida o fija o la diferencia tolerada incluye evaluar uno o más resultados después de la administración al sujeto. En algunos aspectos, los resultados incluyen aquellos seleccionados entre la mejora de un síntoma de enfermedad y los resultados que indican seguridad y/o baja o ausencia de toxicidad.

[0349] En ciertos casos, una composición de células de salida producida mediante los métodos descritos en el presente documento tiene una proporción de células T CD4+ modificadas con respecto a células T CD8+ modificadas de entre 2:1 y 0,5:1. En ciertos casos, la composición de salida contiene una proporción de células T CD4+ modificadas con respecto a células T CD8+ modificadas de o aproximadamente 1:1. En algunos casos, la composición de células de salida se produjo a partir de una composición de células de entrada descrita en el presente documento, por ejemplo, una composición de células de entrada descrita en la Sección IA, y tiene una proporción de células T CD4+ modificadas genéticamente a células T CD8+ modificadas genéticamente de entre 2:1 y 0,5:1. En casos particulares, la composición de células de salida producida a partir de una composición de células de entrada tiene una proporción de células T CD4+ modificadas con respecto a células T CD8+ modificadas de 1:1 con una diferencia tolerada del

50 %, 25 %, 10 % o menos. En ciertos casos, las células T modificadas expresan un receptor recombinante. En ciertos casos, las células T diseñadas expresan un CAR.

II. COMPOSICIONES Y FORMULACIONES

[0350] En el presente documento se describen composiciones o formulaciones que contienen células preparadas según los métodos de incubación (por ejemplo, estimulación) descritos en el presente documento. En algunos casos, las composiciones y métodos descritos en el presente documento se pueden usar para obtener una composición de células de salida de células con una proporción definida de receptor recombinante que expresa células T CD4+ a CD8+, tal como para usar como composición de células terapéutica. También se divulga en el presente documento una composición de células de salida producida mediante cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

[0351] En algunos casos, las células producidas usando cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, por ejemplo, células de la composición de células de salida, se divulgan como composiciones, que incluyen composiciones y formulaciones farmacéuticas, tales como composiciones en forma de dosis unitaria que incluyen el número de células para administración en una dosis dada o fracción de la misma. En casos particulares, las células de la composición de células de salida se modifican genéticamente con un receptor recombinante (por ejemplo, células CAR-T). En ciertos casos, las composiciones y formulaciones farmacéuticas generalmente incluyen uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables opcionales. En algunos casos, la composición incluye al menos un agente terapéutico adicional.

[0352] En algunos casos, se genera o fabrica una composición de células, por ejemplo, una composición de células de salida, con el fin de una terapia celular. En algunos casos, la composición de células es una composición o formulación farmacéutica. Dichas composiciones se pueden usar de acuerdo con los métodos descritos, por ejemplo, para evaluar su liberación para su uso en la prevención o tratamiento de enfermedades, afecciones y trastornos, o en métodos de detección, diagnóstico y pronóstico.

[0353] El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en una forma tal que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en ella sea efectiva, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto para el cual la formulación sería administrado. En algunos casos, los métodos descritos en el presente documento se pueden usar para comparar la expresión de glucanos en la superficie de composiciones celulares compuestas por las mismas células diseñadas, pero con diferentes formulaciones farmacéuticas.

[0354] Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no es tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, entre otros, un tampón, excipiente, estabilizador o conservante. En casos particulares, los métodos descritos en el presente documento se pueden usar para comparar la expresión de glucanos en la superficie de composiciones celulares compuestas por las mismas células diseñadas, pero con diferentes vehículos farmacéuticamente aceptables.

[0355] En algunos casos, la terapia con células T, como las células T modificadas genéticamente (por ejemplo, células T CAR), se formulan con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunos aspectos, la elección del vehículo está determinada en parte por la célula particular y/o por el método de administración. Por consiguiente, existen diversas formulaciones adecuadas. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede contener conservantes. Los conservantes adecuados pueden incluir, por ejemplo, metilparabeno, propilparabeno, benzoato de sodio y cloruro de benzalconio. En algunos aspectos, se utiliza una mezcla de dos o más conservantes. El conservante o sus mezclas están típicamente presentes en una cantidad de aproximadamente 0,0001 % a aproximadamente 2 % en peso de la composición total. Los vehículos se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A Ed. (1980). Los vehículos farmacéuticamente aceptables generalmente no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas e incluyen, entre otros: tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluidos glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como polietilenglicol (PEG).

[0356] En las composiciones se incluyen agentes tampón en algunos aspectos. Los agentes tampón adecuados incluyen, por ejemplo, ácido cítrico, citrato de sodio, ácido fosfórico, fosfato de potasio y otros ácidos y sales diversos. En algunos aspectos, se utiliza una mezcla de dos o más agentes tampón. El agente tampón o sus mezclas están típicamente presentes en una cantidad de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 4 % en peso de la composición total. Se conocen métodos para preparar composiciones farmacéuticas administrables. Los métodos

ejemplares se describen con más detalle en, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21ª edición. (1 de mayo de 2005).

[0357] Las formulaciones pueden incluir soluciones acuosas. La formulación o composición también puede contener más de un ingrediente activo útil para la indicación, enfermedad o condición particular que se previene o trata con las células, incluyendo uno o más ingredientes activos donde las actividades son complementarias a las células y/o las actividades respectivas no se afectan negativamente unas a otras. Dichos ingredientes activos están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que sean eficaces para el fin previsto. Así, en algunos casos, la composición farmacéutica incluye además otros agentes o fármacos farmacéuticamente activos, tales como agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, asparaginasa, busulfán, carboplatino, cisplatino, daunorrubicina, doxorubicina, fluorouracilo, gemcitabina, hidroxiurea, metotrexato, paclitaxel, rituximab, vinblastina, vincristina, etc.

[0358] La composición farmacéutica, en algunos casos, contiene células, por ejemplo, células de la composición de células de salida, en cantidades eficaces para tratar o prevenir la enfermedad o afección, tal como una cantidad terapéuticamente eficaz o profilácticamente eficaz. La eficacia terapéutica o profiláctica en algunos casos se controla mediante evaluaciones periódicas de los sujetos tratados. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se repite hasta que se produce la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles y pueden determinarse. La dosis deseada se puede administrar mediante una única administración en bolo de la composición, mediante múltiples administraciones en bolo de la composición o mediante administración en infusión continua de la composición.

[0359] Las células, por ejemplo, células de la composición de células resultante, pueden formularse para administración usando técnicas, formulaciones y/o dispositivos de administración estándar. Se describen formulaciones y dispositivos, tales como jeringas y viales, para el almacenamiento y administración de las composiciones. Con respecto a las células, la administración puede ser autóloga o heteróloga. Por ejemplo, se pueden obtener células o progenitores inmunorresponsables de un sujeto y administrarse al mismo sujeto o a un sujeto diferente compatible. Las células inmunorresponsivas derivadas de sangre periférica o su progenie (por ejemplo, derivadas in vivo, ex vivo o in vitro) se pueden administrar mediante inyección localizada, incluyendo administración con catéter, inyección sistémica, inyección localizada, inyección intravenosa o administración parenteral. Cuando se administra una composición terapéutica (por ejemplo, una composición farmacéutica que contiene una célula inmunosensible modificada genéticamente), generalmente se formulará en una forma inyectable de dosificación unitaria (solución, suspensión, emulsión).

[0360] Las formulaciones incluyen aquellas para administración oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, pulmonar, transdérmica, intramuscular, intranasal, bucal, sublingual o en supositorios. En algunos casos, el agente o las poblaciones celulares se administran por vía parenteral. El término "parenteral", como se usa en el presente documento, incluye administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, rectal, vaginal e intraperitoneal. En algunos casos, el agente o las poblaciones celulares se administran a un sujeto mediante administración sistémica periférica mediante inyección intravenosa, intraperitoneal o subcutánea.

[0361] En algunos casos, las composiciones se describen como preparaciones líquidas estériles, por ejemplo, soluciones acuosas isotónicas, suspensiones, emulsiones, dispersiones o composiciones viscosas, que en algunos aspectos pueden tamponarse a un pH seleccionado. Las preparaciones líquidas normalmente son más fáciles de preparar que los geles, otras composiciones viscosas y las composiciones sólidas. Además, las composiciones líquidas son algo más cómodas de administrar, especialmente mediante inyección. Por otro lado, las composiciones viscosas se pueden formular dentro del rango de viscosidad apropiado para proporcionar períodos de contacto más prolongados con tejidos específicos. Las composiciones líquidas o viscosas pueden comprender vehículos, que pueden ser un disolvente o un medio dispersante que contenga, por ejemplo, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido) y mezclas adecuadas de los mismos.

[0362] Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando las células en un disolvente, tal como en mezcla con un vehículo, diluyente o excipiente adecuado tal como agua estéril, solución salina fisiológica, glucosa, dextrosa o similares. Las composiciones también pueden liofilizarse. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares tales como agentes humectantes, dispersantes o emulsionantes (por ejemplo, metilcelulosa), agentes tampón del pH, aditivos gelificantes o mejoradores de la viscosidad, conservantes, agentes aromatizantes, colorantes y similares, dependiendo de la vía de administración y de la preparación deseada. En algunos aspectos se pueden consultar los textos estándar para preparar preparativos adecuados.

[0363] Se pueden añadir diversos aditivos que mejoran la estabilidad y esterilidad de las composiciones, incluidos conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y tampones. La prevención de la acción de los microorganismos puede garantizarse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede conseguirse mediante el uso de agentes que retrasen la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

[0364] Las formulaciones que se van a utilizar para la administración in vivo son generalmente estériles. La esterilidad puede lograrse fácilmente, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

[0365] Para la prevención o el tratamiento de una enfermedad, la dosis adecuada puede depender del tipo de enfermedad a tratar, el tipo de agente o agentes, el tipo de células o receptores recombinantes, la gravedad y el curso de la enfermedad, si el agente o las células se administran con fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, la historia clínica del sujeto y la respuesta al agente o las células, y a criterio del médico tratante. En algunos casos, las composiciones se administran adecuadamente al sujeto en una sola vez o durante una serie de tratamientos.

III. MÉTODOS DE ADMINISTRACIÓN

[0366] También se describen métodos de uso y usos de las células y composiciones, tales como las presentes en una composición de salida descrita en el presente documento, en el tratamiento de enfermedades, afecciones y trastornos en los que se expresa el antígeno reconocido por el receptor recombinante (por ejemplo, CAR). También se describen en el presente documento métodos de tratamiento que incluyen la administración a un sujeto de una composición de células producidas mediante cualquiera de los métodos de ingeniería descritos. En algunos casos, el método incluye generar células T genéticamente modificadas, tales como células T genéticamente modificadas de la composición de células de salida, usando cualquiera de los métodos descritos en el presente documento y administrar las células T genéticamente modificadas producidas mediante los métodos descritos en el presente documento.

[0367] Se describen métodos para administrar las células y composiciones diseñadas, y usos de dichas células y composiciones diseñadas para tratar o prevenir enfermedades, afecciones y trastornos, incluidos los cánceres. Los métodos y usos divulgados incluyen métodos y usos para terapia celular adoptiva. En algunos casos, los métodos incluyen la administración de las células diseñadas o una composición que contiene las células, tales como células de una composición resultante como se describe, a un sujeto, tejido o célula, tal como uno que tiene, está en riesgo de tener o se sospecha que tiene la enfermedad, condición o trastorno. En algunos casos, las células, poblaciones y composiciones se administran a un sujeto que tiene la enfermedad o afección particular que se va a tratar, por ejemplo, mediante terapia con células adoptivas, tal como terapia con células T adoptivas. En algunos casos, las células o composiciones se administran al sujeto, tal como un sujeto que tiene o está en riesgo de padecer la enfermedad o afección, mejorar uno o más síntomas de la enfermedad o afección, tal como disminuyendo la carga tumoral en un cáncer que expresa un antígeno reconocido por una célula T modificada.

[0368] La enfermedad o afección que se trata en algunos aspectos puede ser cualquiera en la que la expresión de un antígeno esté asociada, específica y/o expresada en una célula o tejido de una enfermedad, trastorno o afección y/o implicada en la etiología de una enfermedad, afección o trastorno, por ejemplo, causa, exacerba o de otro modo está implicado en dicha enfermedad, afección o trastorno. Las enfermedades y afecciones ejemplares pueden incluir enfermedades o afecciones asociadas con malignidad o transformación de células (por ejemplo, cáncer), enfermedades autoinmunitarias o inflamatorias, o una enfermedad infecciosa, por ejemplo causada por una bacteria, un virus u otro patógeno. Antígenos ejemplares, que incluyen antígenos asociados con diversas enfermedades y afecciones que pueden tratarse, se describen anteriormente. En casos particulares, el polipéptido inmunomodulador y/o el receptor recombinante, por ejemplo, el receptor de antígeno quimérico o TCR, se une específicamente a un antígeno asociado con la enfermedad o afección. En algunos casos, el sujeto tiene una enfermedad, trastorno o afección, opcionalmente un cáncer, un tumor, una enfermedad, trastorno o afección autoinmunitaria, o una enfermedad infecciosa.

[0369] En algunos casos, la enfermedad, trastorno o afección incluye tumores asociados con diversos cánceres. En algunos casos, el cáncer puede ser cualquier cáncer localizado en el cuerpo de un sujeto, tal como, entre otros, cánceres localizados en la cabeza y el cuello, mama, hígado, colon, ovario, próstata, páncreas, cerebro, cuello uterino, hueso, piel, ojos, vejiga, estómago, esófago, peritoneo o pulmón. Por ejemplo, el agente anticancerígeno se puede usar para el tratamiento de cáncer de colon, cáncer de cuello uterino, cáncer del sistema nervioso central, cáncer de mama, cáncer de vejiga, carcinoma anal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de células pequeñas, cáncer de pulmón, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, cáncer neuroendocrino, carcinoma de tejido blando, cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer de vesícula biliar o cáncer de esófago. En algunos casos, el cáncer puede ser un cáncer de la sangre. En algunos casos, la enfermedad, trastorno o afección es un tumor, tal como un tumor sólido, linfoma, leucemia, tumor sanguíneo, tumor metastásico u otro tipo de cáncer o tumor. En algunos casos, la enfermedad, trastorno o afección se selecciona entre cánceres de colon, pulmón, hígado, mama, próstata, ovario, piel, melanoma, hueso, cáncer de cerebro, cáncer de ovario, cánceres epiteliales, carcinoma de células renales, adenocarcinoma de páncreas, carcinoma cervical, cáncer colorrectal, glioblastoma, neuroblastoma, sarcoma de Ewing, meduloblastoma, osteosarcoma, sarcoma sinovial y/o mesotelioma.

[0370] Entre las enfermedades, afecciones y trastornos se encuentran tumores, incluidos tumores sólidos, neoplasias malignas hematológicas y melanomas, e incluidos tumores localizados y metastásicos, enfermedades infecciosas, tales como infección con un virus u otro patógeno, por ejemplo, VIH, VHC, VHB, CMV, VPH y enfermedades parasitarias, y enfermedades autoinmunes e inflamatorias. En algunos casos, la enfermedad, trastorno o afección es un tumor, cáncer, malignidad, neoplasia u otra enfermedad o trastorno proliferativo. Dichas

enfermedades incluyen, entre otras, leucemia, linfoma, por ejemplo, leucemia mieloide (o mielógena) aguda (LMA), leucemia mieloide (o mielógena) crónica (LMC), leucemia linfocítica (o linfoblástica) aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia de células peludas (LCP), linfoma linfocítico pequeño (LLP), linfoma de células del manto (LCM), linfoma de la zona marginal, linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin (HL), linfoma no Hodgkin (LNH), linfoma anaplásico de células grandes (LACG), linfoma folicular, linfoma folicular refractario, linfoma difuso de células B grandes (LDCBG) y mieloma múltiple (MM), se selecciona una neoplasia maligna de células B entre la leucemia linfoblástica aguda (LLA), la LLA en adultos y la leucemia linfoblástica crónica (LLC), linfoma no Hodgkin (LNH) y linfoma difuso de células B grandes (LDCBG).

[0371] En algunos casos, la enfermedad o afección es una enfermedad o afección infecciosa, como por ejemplo, entre otras, infecciones virales, retrovirales, bacterianas y protozoarias, inmunodeficiencia, citomegalovirus (CMV), virus de Epstein-Barr (EBV), adenovirus, poliomavirus BK. En algunos casos, la enfermedad o afección es una enfermedad o afección autoinmunitaria o inflamatoria, tal como artritis, por ejemplo, artritis reumatoide (AR), diabetes tipo I, lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, esclerodermia, tiroides autoinmune, enfermedad de Graves, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, asma y/o una enfermedad o afección asociada con el trasplante.

[0372] En algunos casos, el antígeno asociado con la enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en receptor de tirosina quinasa huérfano ROR1, antígeno de maduración de células B (BCMA), anhidrasa carbónica 9 (CAIX), tEGFR, Her2/neu (receptor de tirosina quinasa erbB2), L1-CAM, CD19, CD20, CD22, mesotelina, CEA, antígeno de superficie de la hepatitis B, receptor antifolato, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, glicoproteína epitelial 2 (EPG-2), glicoproteína epitelial 40 (EPG-40), receptor de efrina A2 (EPHa2), Her2/neu (receptor tirosina quinasa erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), dímeros erbB, mutación del receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo III (EGFR VIII), proteína de unión a folato (FBP), FCRL5, receptor de Fc tipo 5 (FCRL5; también conocido como homólogo del receptor de Fc 5 o FCRH5), receptor de acetilcolina fetal, gangliósido GD2, gangliósido GD3, receptor acoplado a proteína G 5D (GPCR5D), HMW-MAA, IL-22R-alfa, IL-13R-alfa2, receptor de dominio de inserción de quinasa (kdr), cadena ligera kappa, repetición rica en leucina que contiene 8 miembros de la familia A (LRRC8A), Lewis Y, molécula de adhesión de células LI (LI-CAM), antígeno asociado al melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, antígeno de melanoma expresado preferentemente (PRAME), survivina, TAG72, B7-H6, receptor alfa 2 de IL-13 (IL-13Ra2), CA9, GD3, HMW-MAA, CDI 71, G250/CAIX, Antígeno leucocitario humano A1 (HLA-A1), MAGE A1, HLA-A2, NY-ESO-1, PSCA, receptor de folato a, CD44v6, CD44v7/8, integrina $\alpha\beta 6$ (integrina $\alpha v\beta 6$), 8H9, NCAM, receptores VEGF, 5T4, AchR fetal, ligandos del miembro D del grupo 2 asesino natural (NKG2D), CD44v6, antígeno dual, un antígeno de cáncer de testículo, mesotelina, CMV murino, mucina 1 (MUC1), MUC16, antígeno de células madre de próstata (PSCA), NKG2D, un antígeno de cáncer de testículo/antígeno de testículo IB (CTAG, también conocido como NY-ESO-1 y LAGE-2), MART-1, glicoproteína 100 (gp100), antígeno oncofetal, ROR1, glicoproteína trofoblástica (TPBG también conocida como 5T4), TAG72, VEGF-R2, antígeno carcinoembrionario (CEA), Her2/neu, receptor de estrógeno, receptor de progesterona, efrinB2, CD123, c-Met, GD-2, GD2 O-acetilado (OGD2), CE7, tumor de Wilms 1 (WT-1), una ciclina, ciclina A2, ligando de quimiocina con motivo CC 1 (CCL-1), CD138, un antígeno específico de patógeno y un antígeno asociado con una etiqueta universal, y/o moléculas biotiniladas, y/o moléculas expresadas por VIH, VHC, VHB u otros patógenos.

[0373] En algunos casos, el antígeno o ligando es un antígeno tumoral o marcador de cáncer. En algunos casos, el antígeno o ligando del antígeno es o incluye el receptor de tirosina quinasa huérfano (ROR1), el antígeno de maduración de células B (BCMA), la anhidrasa carbónica 9 (CA9, también conocida como CAIX o G250), Her2/neu (receptor de tirosina quinasa erbB2), CD19, CD20, CD22, mesotelina (MSLN), antígeno carcinoembrionario (CEA) y antígeno de superficie de la hepatitis B, receptor antifolato, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, proteoglicano 4 de sulfato de condroitina (CSPG4), EGFR, glicoproteína epitelial 2 (EPG-2), glicoproteína epitelial 40 (EPG-40), receptor de efrina A2 (EPHa2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), dímeros de erbB, factor de crecimiento epidérmico tipo III mutación del receptor (EGFR VIII), proteína de unión a folato (FBP), receptor de Fc tipo 5 (FCRL5, también conocido como homólogo 5 del receptor de Fc o FCRH5), receptor de acetilcolina fetal (AchR fetal), gangliósido GD2, gangliósido GD3, antígeno leucocitario humano A1 (HLA-A1), antígeno leucocitario humano A2 (HLA-A2), receptor alfa de IL-22 (IL-22Ra), receptor de dominio de inserción de quinasa (kdr), cadena ligera kappa, repetición rica en leucina que contiene 8 miembros de la familia A (LRRC8A), Lewis Y, molécula de adhesión de células LI (LI-CAM), antígeno asociado a melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE A6, MAGE-A10, antígeno de melanoma expresado preferentemente (PRAME), survivina, glicoproteína asociada a tumores 72 (TAG72), B7-H3, B7-H6, receptor alfa 2 de IL-13 (IL-13Ra2), antígeno asociado al melanoma de alto peso molecular humano (HMW-MAA), CD171, receptor alfa de folato, CD44v7/8, integrina $\alpha\beta 6$ (integrina $\alpha v\beta 6$), 8H9, molécula de adhesión de células neurales (NCAM), receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (receptores VEGF o VEGFR), glicoproteína del trofoblasto (TPBG también conocida como 5T4), ligandos NKG2D, CD44v6, antígeno dual, un antígeno de cáncer de testículo, citomegalovirus murino (CMV), mucina 1 (MUC1), MUC16, antígeno de células madre de próstata (PSCA), antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), ligandos del miembro D del grupo 2 del asesino natural (NKG2D), antígeno de cáncer/testículo 1B (CTAG, también conocido como NY-ESO-1 y LAGE-2), melan A (MART-1), glicoproteína 100 (gp100), glipican-3 (GPC3), receptor acoplado a proteína G 5D (GPCR5D), antígeno oncofetal, TAG72, proteína 1 relacionada con la tirosinasa (TRP1, también conocida como TYRP1 o gp75), proteína 2 relacionada con la tirosinasa (TRP2, también conocida como dopacromo tautomerasa, dopacromo delta-isomerasa o DCT), receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF R2), antígeno carcinoembrionario (CEA), receptor de estrógeno, receptor de

progesterona, un antígeno prostático específico, ephrinB2, CD123, CD133, c-Met, GD2 O-acetilado (OGD2), epítipo CE7 de LI-CAM, tumor de Wilms 1 (WT-1), una ciclina, ciclina A2, ligando de quimiocina con motivo C-C 1 (CCL-1), CD138, un antígeno específico de patógeno o antígeno expresado por patógeno, y un antígeno asociado con una etiqueta universal, y/o moléculas biotiniladas, y/o moléculas expresadas por VIH, VHC, VHB u otros patógenos.

[0374] En algunos casos, la enfermedad o afección es una neoplasia maligna de células B. En algunos casos, la neoplasia maligna de células B es una leucemia o un linfoma. En algunos aspectos, la enfermedad o afección es leucemia linfoblástica aguda (LLA), LLA en adultos, leucemia linfoblástica crónica (LLC), linfoma no Hodgkin (LNH) o linfoma difuso de células B grandes (LDCBG). En algunos casos, la enfermedad o afección es un LNH, como o incluyendo un LNH que es un LNH agresivo, linfoma difuso de células B grandes (LDCBG), NOS (de novo y transformado de indolente), linfoma mediastínico primario de células B grandes (PMBCL), linfoma de células B grandes rico en células T/histocitos (TCHRBCL), linfoma de Burkitt, linfoma de células del manto (LCM) y/o linfoma folicular (LF), opcionalmente, linfoma folicular de grado 3B (FL3B). En algunos aspectos, el receptor recombinante, tal como un CAR, se une específicamente a un antígeno asociado con la enfermedad o afección o expresado en células del entorno de una lesión asociada con la enfermedad maligna de células B. Los antígenos a los que se dirigen los receptores en algunos casos incluyen antígenos asociados con una enfermedad maligna de células B, tales como cualquiera de varios marcadores de células B conocidos. En algunos casos, el antígeno al que se dirige el receptor es CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Igkappa, Iglambda, CD79a, CD79b o CD30.

[0375] En algunos casos, la enfermedad o afección es un mieloma, como un mieloma múltiple. En algunos aspectos, el receptor recombinante, tal como un CAR, se une específicamente a un antígeno asociado con la enfermedad o afección o expresado en células del entorno de una lesión asociada con el mieloma múltiple. Los antígenos a los que se dirigen los receptores en algunos casos incluyen antígenos asociados con el mieloma múltiple, como GPRCSD o BCMA.

[0376] En algunos casos, el antígeno es un antígeno específico de patógeno o expresado por patógeno. En algunos casos, el antígeno es un antígeno viral (tal como un antígeno viral del VIH, VHC, VHB, etc.), antígenos bacterianos y/o antígenos parásitos.

[0377] En algunos casos, la terapia basada en células es o comprende la administración de células, tales como células T, que se dirigen a una molécula expresada en la superficie de una lesión, tal como un tumor o un cáncer. En algunos casos, las células inmunitarias expresan un receptor de células T (TCR) u otro receptor de unión a antígeno. En algunos casos, las células inmunitarias expresan un receptor recombinante, como un TCR transgénico o un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunos casos, las células son autólogas del sujeto. En algunos casos, las células son alogénicas del sujeto.

[0378] Los métodos para la administración de células diseñadas para terapia celular adoptiva son conocidos y pueden usarse en relación con los métodos y composiciones divulgados. Por ejemplo, los métodos de terapia adoptiva con células T se describen, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente estadounidense nº 2003/0170238 de Gruenberg et al; Patente de EE. UU. nº 4.690.915 de Rosenberg; Rosenberg (2011) Nat Rev Clin Oncol. 8(10):577-85). Véase, por ejemplo, Themeli et al, (2013) Nat Biotechnol. 31(10): 928-933; Tsukahara et al, (2013) Biochem Biophys Res Commun 438(1): 84-9; Davila et al, (2013) PLoS ONE 8(4): e61338.

[0379] En algunos casos, la terapia celular, por ejemplo, terapia de células T adoptivas, se lleva a cabo mediante transferencia autóloga, en la que las células se aíslan y/o se preparan de otro modo a partir del sujeto que va a recibir la terapia celular, o de una muestra derivada de tal sujeto. Por lo tanto, en algunos aspectos, las células se derivan de un sujeto, por ejemplo, un paciente, que necesita un tratamiento y las células, después del aislamiento y el procesamiento, se administran al mismo sujeto.

[0380] En algunos casos, la terapia celular, por ejemplo, terapia de células T adoptivas, se lleva a cabo mediante transferencia alogénica, en la que las células se aíslan y/o se preparan de otro modo a partir de un sujeto distinto del sujeto que va a recibir o que finalmente recibe la célula. terapia, por ejemplo, un primer sujeto. En tales casos, las células se administran, a continuación, a un sujeto diferente, por ejemplo, un segundo sujeto, de la misma especie. En algunos casos, el primer y el segundo sujeto son genéticamente idénticos. En algunos casos, el primer y el segundo sujeto son genéticamente similares. En algunos casos, el segundo sujeto expresa la misma clase o supertipo HLA que el primer sujeto. Las células pueden administrarse por cualquier medio adecuado. La dosificación y la administración pueden depender en parte de si la administración es breve o crónica. Varios programas de dosificación incluyen, entre otros, administraciones únicas o múltiples en varios momentos, administración en bolo e infusión en pulsos.

[0381] En algunos casos, los métodos divulgados incluyen una o más etapas de administración a un sujeto de células de la composición de células de salida, tal como una composición de células descrita en la Sección I. En ciertos casos, las células de la composición de células de salida incluyen células T CD4+ modificadas genéticamente. y células T CD8+ modificadas genéticamente. En algunos casos, las células T CD4+ y CD8+ modificadas genéticamente expresan un receptor de células T (TCR) u otro receptor de unión a antígeno. En algunos casos, las células inmunitarias expresan un receptor recombinante, como un TCR transgénico o un receptor de antígeno quimérico

(CAR). En algunos casos, las células de la composición de células de salida son autólogas del sujeto. En algunos casos, las células son alogénicas del sujeto.

[0382] En ciertos casos, las células T CD4+ y las células T CD8+ de la composición de células de salida se administran al sujeto en la misma composición, dosis o mezcla. Así, en algunos casos, el receptor recombinante que expresa células T CD4+ y el receptor recombinante que expresa células T CD8+, por ejemplo, CAR+CD4+ y CAR+CD8+ se administran al sujeto en la misma composición, dosis o mezcla.

[0383] En ciertos casos, las células, por ejemplo, las células de la composición de células de salida o poblaciones individuales de subtipos de células, se administran al sujeto en un rango de aproximadamente un millón a aproximadamente 100 mil millones de células y/o esa cantidad de células por kilogramo de peso corporal, tal como, por ejemplo, de 1 millón a aproximadamente 50 mil millones de células (por ejemplo, aproximadamente 5 millones de células, aproximadamente 25 millones de células, aproximadamente 500 millones de células, aproximadamente 1 mil millones de células, aproximadamente 5 mil millones de células, aproximadamente 20 mil millones de células, aproximadamente 30 mil millones de células, aproximadamente 40 mil millones de células, o un rango definido por dos cualesquiera de los valores anteriores), tal como aproximadamente 10 millones a aproximadamente 100 mil millones de células (por ejemplo, aproximadamente 20 millones de células, aproximadamente 30 millones de células, aproximadamente 40 millones de células, aproximadamente 60 millones de células, alrededor de 70 millones de células, alrededor de 80 millones de células, alrededor de 90 millones de células, alrededor de 10 mil millones de células, alrededor de 25 mil millones de células, alrededor de 50 mil millones de células, alrededor de 75 mil millones de células, alrededor de 90 mil millones de células, o un rango definido por dos cualesquiera de los valores anteriores), y en algunos casos alrededor de 100 millones de células a alrededor de 50 mil millones de células (por ejemplo, alrededor de 120 millones de células, alrededor de 250 millones de células, alrededor de 350 millones de células, alrededor de 450 millones de células, alrededor de 650 millones de células, alrededor de 800 millones de células, aproximadamente 900 millones de células, aproximadamente 3 mil millones de células, aproximadamente 30 mil millones de células, aproximadamente 45 mil millones de células) o cualquier valor entre estos rangos y/o por kilogramo de peso corporal. Las dosis pueden variar dependiendo de los atributos particulares de la enfermedad o trastorno y/o del paciente y/u otros tratamientos.

[0384] En algunos casos, por ejemplo, cuando el sujeto es un ser humano, la dosis incluye menos de aproximadamente 1×10^8 células que expresan el receptor recombinante total (por ejemplo, CAR), células T o células mononucleares de sangre periférica (PBMC), por ejemplo, en el rango de aproximadamente 1×10^6 a 1×10^8 de dichas células, tal como 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 o 1×10^8 o el total de dichas células, o el rango entre dos cualesquiera de los anteriores valores.

[0385] En algunos casos, la dosis de células genéticamente modificadas comprende de o desde aproximadamente 1×10^5 a 5×10^8 células T que expresan CAR en total, 1×10^5 a $2,5 \times 10^8$ células T que expresan CAR en total, 1×10^5 a 1×10^8 total de células T que expresan CAR, 1×10^5 a 5×10^7 total de células T que expresan CAR, 1×10^5 a $2,5 \times 10^7$ total de células T que expresan CAR, 1×10^5 a 1×10^7 total de células T que expresan CAR, 1×10^5 a 5×10^6 células T que expresan CAR en total, 1×10^5 a $2,5 \times 10^6$ células T que expresan CAR en total, 1×10^5 a 1×10^6 células T que expresan CAR en total, 1×10^6 a 5×10^8 células T que expresan CAR en total, 1×10^6 a 5×10^8 células T que expresan CAR en total células T que expresan CAR, 1×10^6 a $2,5 \times 10^8$ células T que expresan CAR en total, 1×10^6 a 1×10^8 células T que expresan CAR en total, 1×10^6 a 5×10^7 células T que expresan CAR en total, 1×10^6 a 1×10^7 células T que expresan CAR en total, 1×10^6 a 5×10^6 células T que expresan CAR en total, 1×10^6 a $2,5 \times 10^6$ células T que expresan CAR en total células, $2,5 \times 10^6$ a 5×10^8 células T que expresan CAR en total, $2,5 \times 10^6$ a $2,5 \times 10^8$ células T que expresan CAR en total, $2,5 \times 10^6$ a 1×10^8 células T que expresan CAR en total, $2,5 \times 10^6$ a 5×10^7 células T que expresan CAR en total, $2,5 \times 10^6$ a $2,5 \times 10^7$ células T que expresan CAR en total, $2,5 \times 10^6$ a 1×10^7 células T que expresan CAR en total, $2,5 \times 10^6$ a 5×10^6 células T que expresan CAR en total, 5×10^6 a 5×10^8 células T que expresan CAR en total, 5×10^6 a $2,5 \times 10^8$ células T que expresan CAR en total, 5×10^6 a $2,5 \times 10^7$ células T que expresan CAR en total, 5×10^6 a 1×10^7 células T que expresan CAR en total, 5×10^6 a 1×10^8 células T que expresan CAR en total, 1×10^7 a 5×10^8 células T que expresan CAR en total, 1×10^7 a $2,5 \times 10^8$ células T que expresan CAR en total, 1×10^7 a 1×10^8 células T que expresan CAR en total, 1×10^7 a 5×10^7 células T que expresan CAR en total, 1×10^7 a $2,5 \times 10^7$ células T que expresan CAR en total, $2,5 \times 10^7$ a 5×10^8 células T que expresan CAR en total, $2,5 \times 10^7$ a 1×10^8 células T que expresan CAR en total, $2,5 \times 10^7$ a 5×10^7 células T que expresan CAR en total, 5×10^7 a 5×10^8 células T que expresan CAR en total, 5×10^7 a 1×10^8 células T que expresan CAR en total, 1×10^8 a 5×10^8 células T que expresan CAR en total, 1×10^8 a $2,5 \times 10^8$ células T que expresan CAR en total, o $2,5 \times 10^8$ a 5×10^8 células T que expresan CAR en total.

[0386] En algunos casos, la dosis de células modificadas genéticamente comprende al menos o al menos aproximadamente 1×10^5 células que expresan CAR, al menos o al menos aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células que expresan CAR, al menos o al menos aproximadamente 5×10^5 células que expresan CAR, al menos o al menos aproximadamente 1×10^6 células que expresan CAR, al menos o al menos aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células que expresan CAR, al menos o al menos aproximadamente 5×10^6 células que expresan CAR, al menos o al menos aproximadamente 1×10^7 células que expresan CAR, al menos o al menos aproximadamente $2,5$

1×10^7 células que expresan CAR, al menos o al menos aproximadamente 5×10^7 células que expresan CAR, al menos o al menos aproximadamente 1×10^8 células que expresan CAR, al menos o al menos aproximadamente $2,5 \times 10^8$ células que expresan CAR, o al menos o al menos aproximadamente 5×10^8 células que expresan CAR.

5 **[0387]** En algunos casos, la terapia celular comprende la administración de una dosis que comprende un número de células de aproximadamente 1×10^5 a 5×10^8 células totales que expresan receptores recombinantes, células T totales o células mononucleares de sangre periférica (PBMC) totales, de o de aproximadamente 5×10^5 a 1×10^7 células totales que expresan receptores recombinantes, células T totales o células mononucleares de sangre periférica (PBMC) totales o de aproximadamente 1×10^6 a 1×10^7 células totales que expresan receptores recombinantes, células T totales, o células mononucleares de sangre periférica total (PBMC), cada una inclusive. En algunos casos, la terapia celular comprende la administración de una dosis de células que comprenden un número de células de al menos o al menos aproximadamente 1×10^5 células que expresan receptores recombinantes totales, células T totales o células mononucleares de sangre periférica (PBMC) totales, tales como al menos o al menos 1×10^6 , al menos o al menos aproximadamente 1×10^7 , al menos o al menos aproximadamente 1×10^8 de tales células. En algunos casos, el número se refiere al número total de CD3+ o CD8+, en algunos casos también de células que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR+). En algunos casos, la terapia celular comprende la administración de una dosis que comprende un número de células de aproximadamente 1×10^5 a 5×10^8 células T totales CD3+ o CD8+ o células que expresan el receptor recombinante CD3+ o CD8+, de aproximadamente 5×10^5 , a 1×10^7 células T CD3+ o CD8+ totales o células que expresan receptores recombinantes CD3+ o CD8+, o de 1×10^6 a 1×10^7 células T totales CD3+ o CD8+ o células que expresan receptores recombinantes CD3+ o CD8+, cada una inclusive. En algunos casos, la terapia celular comprende la administración de una dosis que comprende un número de células de aproximadamente 1×10^5 a 5×10^8 células CD3+/CAR+ o CD8+/CAR+ totales, de o desde aproximadamente 5×10^5 a 1×10^7 células CD3+/CAR+ o CD8+/CAR+ totales, o desde o desde aproximadamente 1×10^6 a 1×10^7 células CD3+/CAR+ o CD8+/CAR+ totales, cada una inclusive.

25 **[0388]** En algunos casos, por ejemplo, cuando el sujeto es humano, las células T CD8+ de la dosis, incluso en una dosis que incluye células T CD4+ y CD8+, incluyen entre aproximadamente 1×10^6 y 5×10^8 células CD8+ que expresan receptores recombinantes totales (por ejemplo, CAR), por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 5×10^6 a 1×10^8 de dichas células, dichas células 1×10^7 , $2,5 \times 10^7$, 5×10^7 , $7,5 \times 10^7$, 1×10^8 o 5×10^8 en total dichas células, o el rango entre dos de los valores anteriores. En algunos casos, al paciente se le administran múltiples dosis, y cada una de las dosis o la dosis total puede estar dentro de cualquiera de los valores anteriores. En algunos casos, la dosis de células comprende la administración de desde o desde aproximadamente 1×10^7 a $0,75 \times 10^8$ células T CD8+ que expresan receptores recombinantes totales, 1×10^7 a $2,5 \times 10^7$ células T CD8+ que expresan receptores recombinantes totales, de o de aproximadamente 1×10^7 a $0,75 \times 10^8$ células T CD8+ que expresan receptores recombinantes totales, cada una inclusive. En algunos casos, la dosis de células comprende la administración de o aproximadamente 1×10^7 , $2,5 \times 10^7$, 5×10^7 , $7,5 \times 10^7$, 1×10^8 o 5×10^8 células T CD8+ que expresan el receptor recombinante total.

40 **[0389]** En algunos casos, la dosis de células, por ejemplo, células T que expresan receptores recombinantes, se administra al sujeto como una dosis única o se administra sólo una vez dentro de un período de dos semanas, un mes, tres meses, seis meses, 1 año o más.

45 **[0390]** En algunos aspectos, las composiciones y formulaciones farmacéuticas se describen como composiciones en forma de dosis unitaria que incluyen el número de células para administración en una dosis determinada o fracción de la misma. En algunos casos, los métodos divulgados producen células en un cronograma predecible hasta la dosificación en comparación con otros métodos de incubación (por ejemplo, estimulación) de células. En algunos casos, la dosis de células para administración se determina basándose en el número de células de tipo ingenuo en la composición de células de entrada.

55 **[0391]** En algunos aspectos, el tamaño de la dosis está determinado por la carga de la enfermedad o afección en el sujeto. Por ejemplo, en algunos aspectos, el número de células administradas en la dosis se determina basándose en la carga tumoral que está presente en el sujeto inmediatamente antes de la administración del inicio de la dosis de células. En algunos casos, el tamaño de la primera dosis y/o de las siguientes está inversamente correlacionado con la carga de morbilidad. En algunos aspectos, como en el contexto de una gran carga de enfermedad, al sujeto se le administra un número bajo de células. En otros casos, como en el contexto de una menor carga de enfermedad, al sujeto se le administra una mayor cantidad de células.

60 **[0392]** Después de la administración de las células, en algunos casos se mide la actividad biológica de las poblaciones de células modificadas genéticamente, por ejemplo, mediante cualquiera de varios métodos conocidos. Los parámetros a evaluar incluyen la unión específica de una célula T natural o modificada u otra célula inmunitaria al antígeno, in vivo, por ejemplo, mediante imágenes, o ex vivo, por ejemplo, mediante ELISA o citometría de flujo. En ciertos casos, la capacidad de las células diseñadas para destruir células diana se puede medir usando cualquier método adecuado, tal como ensayos de citotoxicidad descritos, por ejemplo, en Kochenderfer et al, J. Immunotherapy, 32(7): 689-702 (2009), y Herman et al. J. Métodos inmunológicos, 285(1): 25-40 (2004). En ciertos casos, la actividad

biológica de las células se mide analizando la expresión y/o secreción de una o más citocinas, tales como CD 107a, IFN γ , IL-2 y TNF. En algunos aspectos, la actividad biológica se mide evaluando el resultado clínico, tal como la reducción de la carga o la carga tumoral.

[0393] Las células pueden administrarse por cualquier medio adecuado. Las células se administran en un régimen de dosificación para lograr un efecto terapéutico, como una reducción de la carga tumoral. La dosificación y la administración pueden depender en parte del programa de administración del compuesto inmunomodulador, que puede administrarse antes, después y/o simultáneamente con el inicio de la administración de la terapia con células T. Varios programas de dosificación de la terapia con células T incluyen, entre otros, administraciones únicas o múltiples en varios momentos, administración en bolo e infusión en pulsos. En ciertos casos, las células T modificadas expresan un receptor recombinante. En ciertos casos, las células T diseñadas expresan un CAR.

[0394] En casos particulares, la proporción de células T CD4+ a células T CD8+ que se administran al sujeto en la misma composición, dosis o mezcla está entre 5:1 y 0,2:1, entre 4:1 y 0,25:1, entre 3:1 a 0,33:1, entre 2:1 a 0,5:1, entre 1,5:1 a 0,66:1 o entre 1,25:1 a 0,8:1. En algunos casos, la proporción de células T CD4+ a células T CD8+ administradas al sujeto en la misma composición, dosis o mezcla es o es aproximadamente 2,0:1, 1,9:1, 1,8:1, 1,7:1, 1,6:1, 1,5:1, 1,4:1, 1,3:1, 1,2:1, 1,1:1, 1,0:1, 0,9:1, 0,8:1, 0,7:1, 0,6:1 o 0,5:1.

[0395] En casos particulares, la relación entre el receptor recombinante que expresa células T CD4+ y el receptor recombinante que expresa células T CD8+ que se administran al sujeto en la misma composición, dosis o mezcla está entre 5:1 y 0,2:1, entre 4:1 y 0,25:1, entre 3:1 y 0,33:1, entre 2:1 y 0,5:1, entre 1,5:1 y 0,66:1, o entre 1,25:1 y 0,8:1. En ciertos casos, la proporción entre el receptor recombinante que expresa células T CD4+ y el receptor recombinante que expresa células T CD8+ que se administran al sujeto en la misma composición, dosis o mezcla es aproximadamente 2,0:1, 1,9:1, 1,8:1, 1,7:1, 1,6:1, 1,5:1, 1,4:1, 1,3:1, 1,2:1, 1,1:1, 1,0:1, 0,9:1, 0,8:1, 0,7:1, 0,6:1 o 0,5:1. En casos particulares, la relación entre el receptor recombinante administrado que expresa células T CD4+ y el receptor recombinante que expresa células T CD8+ es o es aproximadamente 1:1. En algunos casos, el receptor recombinante es un TCR o un CAR. En casos particulares, el receptor recombinante es un CAR.

[0396] En algunos casos, la proporción de células T CD4+ modificadas genéticamente a células T CD8+ modificadas genéticamente de la dosis, composición o mezcla que se administra al sujeto está dentro de una cierta diferencia tolerada o rango de error de dicha proporción definida, deseada o fija. En algunos casos, la diferencia tolerada está dentro de o alrededor de 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, o 50 %, del ratio objetivo, definido, preferido y/o fijo.

[0397] En algunos casos, una composición de células producidas mediante los métodos descritos en el presente documento, por ejemplo, una composición de salida, que tiene una proporción de células T CD4+ modificadas con respecto a células T CD8+ modificadas de entre 2:1 y 0,5:1, se administra a un sujeto en una composición única, dosis o mezcla. En ciertos casos, la composición contiene una proporción de células T CD4+ modificadas genéticamente con respecto a células T CD8+ modificadas genéticamente de o de aproximadamente 1:1. En algunos casos, una composición de células producida a partir de una composición de células de entrada, por ejemplo, una composición de células de entrada descrita en la Sección I-AI, tiene una proporción de células T CD4+ modificadas genéticamente a células T CD8+ modificadas genéticamente de entre 2:1 y 0,5:1 y se administra a un sujeto en una única composición, dosis o mezcla. En casos particulares, la composición de células producida a partir de una composición de células de entrada tiene una proporción de células T CD4+ modificadas con respecto a células T CD8+ modificadas de 1:1 con una diferencia tolerada del 50 %, 25 %, 10 % o menos.

[0398] En algunos casos, las células se administran como parte de un tratamiento combinado adicional, tal como simultáneamente o secuencialmente con, en cualquier orden, otra intervención terapéutica, tal como un anticuerpo o una célula modificada genéticamente o un receptor o agente, tal como un agente citotóxico o terapéutico. Por ejemplo, en algunos casos, se puede usar un agente anticancerígeno o un agente inmunomodulador en terapia combinada con terapia celular adoptiva con células modificadas genéticamente que expresan un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR. En algunos contextos, las células se coadministran con otra terapia lo suficientemente prolongada como para que las poblaciones celulares mejoren el efecto de uno o más agentes terapéuticos adicionales, o viceversa. En algunos casos, las células se administran antes de uno o más agentes terapéuticos adicionales. En algunos casos, las células se administran después de uno o más agentes terapéuticos adicionales.

[0399] En algunos casos, uno o más agentes terapéuticos adicionales incluyen una citoquina, tal como IL-2, por ejemplo, para mejorar la persistencia. En algunos casos, los métodos comprenden la administración de un agente quimioterapéutico. En algunos casos, uno o más agentes terapéuticos adicionales incluyen una o más terapias de reducción de linfocitos, tales como antes o simultáneamente con el inicio de la administración de las células diseñadas. En algunos casos, la terapia linfodeplectora comprende la administración de una fosfamida, tal como ciclofosfamida. En algunos casos, la terapia linfodeplectora puede incluir la administración de fludarabina. En algunos casos, la fludarabina se excluye del tratamiento linfodeplector. En algunos casos, no se administra una terapia linfodeplectora.

[0400] En algunos casos, los métodos incluyen administrar un agente acondicionador previo, tal como un agente linfodeplector o quimioterapéutico, tal como ciclofosfamida, fludarabina o combinaciones de los mismos, a un sujeto

antes del inicio de la terapia celular. Por ejemplo, al sujeto se le puede administrar un agente acondicionador previo al menos 2 días antes, tal como al menos 3, 4, 5, 6 o 7 días antes, del inicio de la terapia celular. En algunos casos, al sujeto se le administra un agente de preconditionamiento no más de 7 días antes, tal como no más de 6, 5, 4, 3 o 2 días antes del inicio de la terapia celular.

[0401] En algunos casos, el sujeto está preconditionado con ciclofosfamida en una dosis entre o entre aproximadamente 20 mg/kg y 100 mg/kg, tal como entre o entre aproximadamente 40 mg/kg y 80 mg/kg. En algunos aspectos, el sujeto está preconditionado con o con aproximadamente 60 mg/kg de ciclofosfamida. En algunos casos, la ciclofosfamida se puede administrar en una dosis única o se puede administrar en una pluralidad de dosis, como por ejemplo diariamente, cada dos días o cada tres días. En algunos casos, la ciclofosfamida se administra una vez al día durante uno o dos días. En algunos casos, cuando el agente linfodeplector comprende ciclofosfamida, al sujeto se le administra ciclofosfamida en una dosis entre o entre aproximadamente 100 mg/m² y 500 mg/m², tal como entre o entre aproximadamente 200 mg/m² y 400 mg/m², o 250 mg/m² y 350 mg/m², inclusive. En algunos casos, al sujeto se le administran aproximadamente 300 mg/m² de ciclofosfamida. En algunos casos, la ciclofosfamida se puede administrar en una dosis única o se puede administrar en una pluralidad de dosis, como por ejemplo diariamente, cada dos días o cada tres días. En algunos casos, la ciclofosfamida se administra diariamente, tal como durante 1 a 5 días, por ejemplo, durante 3 a 5 días. En algunos casos, al sujeto se le administran aproximadamente 300 mg/m² de ciclofosfamida, diariamente durante 3 días, antes del inicio de la terapia celular.

[0402] En algunos casos, cuando el agente linfodeplector comprende fludarabina, al sujeto se le administra fludarabina en una dosis entre o entre aproximadamente 1 mg/m² y 100 mg/m², tal como entre o entre aproximadamente 10 mg/m² y 75 mg/m², 15 mg/m² y 50 mg/m², 20 mg/m² y 40 mg/m², o 24 mg/m² y 35 mg/m², inclusive. En algunos casos, al sujeto se le administran aproximadamente 30 mg/m² de fludarabina. En algunos casos, la fludarabina se puede administrar en una dosis única o se puede administrar en una pluralidad de dosis, como por ejemplo diariamente, cada dos días o cada tres días. En algunos casos, la fludarabina se administra diariamente, tal como durante 1 a 5 días, por ejemplo, durante 3 a 5 días. En algunos casos, al sujeto se le administran aproximadamente 30 mg/m² de fludarabina, diariamente durante 3 días, antes del inicio de la terapia celular.

[0403] En algunos casos, el agente linfodeplector comprende una combinación de agentes, tal como una combinación de ciclofosfamida y fludarabina. Por lo tanto, la combinación de agentes puede incluir ciclofosfamida en cualquier dosis o programa de administración, como los descritos anteriormente, y fludarabina en cualquier dosis o programa de administración, como los descritos anteriormente. Por ejemplo, en algunos aspectos, al sujeto se le administran 60 mg/kg (-2 g/m²) de ciclofosfamida y de 3 a 5 dosis de 25 mg/m² de fludarabina antes de la primera dosis o de la siguiente.

IV. ARTÍCULOS DE FABRICACIÓN Y KITS

[0404] También se divulgan artículos de fabricación, tales como kits y dispositivos, para la administración de las células a sujetos de acuerdo con los métodos divulgados para terapia celular adoptiva, y para el almacenamiento y administración de las células y composiciones, tales como las composiciones de entrada o composiciones de salida, como se describe.

[0405] Los artículos de fabricación incluyen uno o más recipientes, típicamente una pluralidad de recipientes, material de embalaje y una etiqueta o prospecto en o asociado con el contenedor o recipientes y/o embalaje, que generalmente incluyen instrucciones para la administración de las células a un sujeto.

[0406] En algunos casos, los recipientes contienen las células que se van a administrar, por ejemplo, una o más dosis unitarias de las mismas. El artículo de fabricación normalmente incluye una pluralidad de recipientes, cada uno de los cuales contiene una única dosis unitaria de las células. La dosis unitaria puede ser una cantidad o número de células que se administrarán al sujeto en la primera dosis o el doble del número (o más) de células que se administrarán en la primera o una o más dosis consecutivas. Puede ser la dosis más baja o la dosis más baja posible de las células que se administrarían al sujeto en relación con el método de administración. En algunos casos, la dosis unitaria es el número mínimo de células o el número de células o el número mínimo de unidades de referencia o las unidades de referencia objetivo o unidades de referencia dentro de un rango objetivo que se administrarían en una dosis única a cualquier sujeto que tenga una enfermedad particular o afección o cualquier tema, de acuerdo con los métodos del presente documento.

[0407] Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas y bolsas flexibles, tales como bolsas de infusión. En casos particulares, los recipientes son bolsas, por ejemplo, bolsas flexibles, tales como las adecuadas para la infusión de células a sujetos, por ejemplo, bolsas de plástico flexible o PVC y/o bolsas de solución intravenosa. En algunos casos, las bolsas se pueden sellar y/o pueden esterilizarse, para proporcionar solución estéril y suministro de las células y composiciones. En algunos casos, los recipientes, por ejemplo bolsas, tienen una capacidad de al menos o aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 o 1000 ml de capacidad, tal como entre o aproximadamente 10 y aproximadamente 100 o entre o aproximadamente 10 y aproximadamente 500 ml de capacidad, cada uno inclusive. En algunos casos, los recipientes, por ejemplo bolsas, están y/o están hechos de material que es estable y/o proporciona almacenamiento estable y/o mantenimiento de células a una o más de

diversas temperaturas, tales como temperaturas frías, por ejemplo, por debajo de a o alrededor de -20 °C, -80 °C, -120 °C, 135 °C y/o temperaturas adecuadas para la criopreservación, y/u otras temperaturas, tales como temperaturas adecuadas para descongelar las células y la temperatura corporal tal como a o alrededor de 37 °C, por ejemplo, para permitir la descongelación, por ejemplo, en la ubicación del sujeto o en la ubicación de tratamiento, por ejemplo, al lado de la cama, inmediatamente antes del tratamiento.

[0408] Los recipientes pueden formarse a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. En algunos casos, el recipiente tiene uno o más puertos, por ejemplo, puertos de acceso estériles, por ejemplo, para conexión de tubos o canulación a uno o más tubos, por ejemplo, para infusión intravenosa u otra y/o para conexión con fines de transferencia a y de otros recipientes, tales como cultivos celulares y/o bolsas de almacenamiento u otros recipientes. Los recipientes ejemplares incluyen bolsas de infusión, bolsas de solución intravenosa, viales, incluidos aquellos con tapones perforables con una aguja para inyección.

[0409] El artículo de fabricación puede incluir además un prospecto o etiqueta con una o más piezas de información de identificación y/o instrucciones de uso. En algunos casos, la información o instrucciones indican que el contenido puede o debe usarse para tratar una condición o enfermedad particular, y/o proporcionar instrucciones para ello. La etiqueta o el prospecto puede indicar que el contenido del artículo de fabricación se utilizará para tratar la enfermedad o afección. En algunos casos, la etiqueta o el prospecto proporciona instrucciones para tratar a un sujeto, por ejemplo, el sujeto del que se derivan las células, mediante un método que implica la administración de una primera y una o más dosis consecutivas de las células, por ejemplo, de acuerdo con cualquiera de las instancias de los métodos divulgados. En algunos casos, las instrucciones especifican la administración, en una primera dosis, de una dosis unitaria, por ejemplo, el contenido de un único recipiente individual en el artículo de fabricación, seguida de una o más dosis consecutivas en un momento específico o dentro de un tiempo específico. ventana y/o después de la detección de la presencia o ausencia o cantidad o grado de uno o más factores o resultados en el sujeto.

[0410] En algunos casos, las instrucciones especifican la administración de una o más dosis unitarias al sujeto.

[0411] En algunos casos, la etiqueta o prospecto o embalaje comprende un identificador para indicar la identidad específica del sujeto del que se derivan las células y/o se van a administrar. En el caso de transferencia autóloga, la identidad del sujeto del que se derivan las células es la misma que la identidad del sujeto al que se van a administrar las células. Por lo tanto, la información de identificación puede especificar que las células se van a administrar a un paciente particular, tal como aquel del que se derivaron originalmente las células. Dicha información puede estar presente en el material de embalaje y/o etiqueta en forma de código de barras u otro identificador codificado, o puede indicar el nombre y/u otras características de identificación del sujeto.

[0412] El artículo de fabricación en algunos casos incluye uno o más, típicamente una pluralidad, de recipientes que contienen composiciones que comprenden las células, por ejemplo, formas de dosis unitarias individuales de las mismas, y además incluye uno o más recipientes adicionales con una composición contenida en ellos que incluye un agente adicional, tal como un agente citotóxico o de otro modo terapéutico, por ejemplo, que se va a administrar en combinación, por ejemplo, simultánea o secuencialmente en cualquier orden, con las células. De forma alternativa, o adicional, el artículo de fabricación puede incluir además otro o el mismo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable. Puede incluir además otros materiales tales como otros tampones, diluyentes, filtros, tubos, agujas y/o jeringas.

[0413] El término "prospecto" se utiliza para referirse a las instrucciones habitualmente incluidas en los paquetes comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, terapia combinada, contraindicaciones y/o advertencias relativas al uso de dichos productos terapéuticos.

V. DEFINICIONES

[0414] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos, notaciones y otros términos o terminología técnicos y científicos utilizados en este documento pretenden tener el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece el tema reivindicado. En algunos casos, los términos con significados comúnmente entendidos se definen en el presente documento para mayor claridad y/o para una fácil referencia, y la inclusión de tales definiciones en el presente documento no debe interpretarse necesariamente como una diferencia sustancial sobre lo que generalmente se entiende en la técnica.

[0415] Como se usa en el presente documento, un "sujeto" es un mamífero, tal como un ser humano u otro animal, y típicamente es un ser humano. En algunas formas de realización, el sujeto, por ejemplo, el paciente, al que se administran los polipéptidos inmunomoduladores, las células modificadas genéticamente o las composiciones, es un mamífero, típicamente un primate, tal como un ser humano. En algunas formas de realización, el primate es un mono o un simio. El sujeto puede ser hombre o mujer y puede tener cualquier edad adecuada, incluidos sujetos infantiles, juveniles, adolescentes, adultos y geriátricos. En algunas formas de realización, el sujeto es un mamífero no primate, tal como un roedor.

[0416] Como se usa en el presente documento, “tratamiento” (y variaciones gramaticales del mismo tales como “tratado” o “tratar”) se refiere a una mejora o reducción completa o parcial de una enfermedad o condición o trastorno, o un síntoma, efecto o resultado adverso, o fenotipo asociado con el mismo. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, entre otros, prevenir la aparición o recurrencia de la enfermedad, aliviar los síntomas, disminuir cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevenir la metástasis, disminuir la tasa de progresión de la enfermedad, mejorar o paliar el estado de la enfermedad y remisión o mejor pronóstico. Los términos no implican la curación completa de una enfermedad ni la eliminación completa de ningún síntoma o efecto sobre todos los síntomas o resultados.

[0417] Como se usa en el presente documento, “retrasar el desarrollo de una enfermedad” significa diferir, obstaculizar, retardar, estabilizar, suprimir y/o posponer el desarrollo de la enfermedad (tal como el cáncer). Este retraso puede ser de duración variable, dependiendo de la historia de la enfermedad y/o del individuo tratado. Como es evidente, un retraso suficiente o significativo puede, en efecto, abarcar la prevención, en el sentido de que el individuo no desarrolle la enfermedad. Por ejemplo, un cáncer en etapa avanzada, como el desarrollo de metástasis, puede retrasarse.

[0418] “Prevenir”, como se utiliza en el presente documento, incluye proporcionar profilaxis con respecto a la aparición o recurrencia de una enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que aún no ha sido diagnosticado con la enfermedad. En algunas formas de realización, las células y composiciones proporcionadas se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para retardar la progresión de una enfermedad.

[0419] Como se usa en el presente documento, “suprimir” una función o actividad es reducir la función o actividad en comparación con las mismas condiciones excepto por una condición o parámetro de interés, o alternativamente, en comparación con otra condición. Por ejemplo, las células que suprimen el crecimiento tumoral reducen la tasa de crecimiento del tumor en comparación con la tasa de crecimiento del tumor en ausencia de las células.

[0420] Una “cantidad eficaz” de un agente, por ejemplo, una formulación, células o composición farmacéutica, en el contexto de la administración, se refiere a una cantidad eficaz, en dosis/cantidades y durante períodos de tiempo necesarios, para lograr un resultado deseado, tal como un resultado terapéutico o profiláctico.

[0421] Una “cantidad terapéuticamente eficaz” de un agente, por ejemplo, una formulación farmacéutica o células modificadas genéticamente, se refiere a una cantidad eficaz, en las dosis y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr un resultado terapéutico deseado, tal como para el tratamiento de una enfermedad, afección, o trastorno, y/o efecto farmacocinético o farmacodinámico del tratamiento. La cantidad terapéuticamente eficaz puede variar según factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del sujeto, y los polipéptidos inmunomoduladores o las células modificadas genéticamente administradas. En algunos casos, los métodos descritos implican la administración de polipéptidos inmunomoduladores, células modificadas genéticamente o composiciones en cantidades eficaces, por ejemplo, cantidades terapéuticamente eficaces.

[0422] Una “cantidad profilácticamente eficaz” se refiere a una cantidad eficaz, en las dosis y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Normalmente, pero no necesariamente, dado que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes o en una etapa anterior de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

[0423] El término “formulación farmacéutica” se refiere a una preparación que está en una forma tal que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en ella sea efectiva, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto para el cual la formulación sería administrada.

[0424] Un “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no es tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, entre otros, un tampón, excipiente, estabilizador o conservante.

[0425] Como se usa en el presente documento, la mención de que las posiciones de nucleótidos o aminoácidos “corresponden” a posiciones de nucleótidos o aminoácidos en una secuencia divulgada, tal como se establece en el listado de secuencias, se refiere a posiciones de nucleótidos o aminoácidos identificadas tras el alineamiento con la secuencia divulgada para maximizar identidad utilizando un algoritmo de alineación estándar, como el algoritmo GAP. Alineando las secuencias, se pueden identificar los residuos correspondientes, por ejemplo, utilizando residuos de aminoácidos conservados e idénticos como guías. En general, para identificar las posiciones correspondientes, las secuencias de aminoácidos se alinean de manera que se obtenga la coincidencia de orden más alto (véase, por ejemplo: Computational Molecular Biology, Lesk, AM, ed, Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, DW, ed, Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, AM y Griffin, HG, eds, Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G, Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J, eds, M Stockton Press, Nueva York, 1991; Carrillo et al. (1988) SIAM J Applied Math 48: 1073).

[0426] Una sustitución de aminoácidos puede incluir la sustitución de un aminoácido en un polipéptido por otro aminoácido. La sustitución puede ser una sustitución de aminoácidos conservadora o una sustitución de aminoácidos no conservadora. Se pueden introducir sustituciones de aminoácidos en una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo, de interés y los productos se analizan para determinar una actividad deseada, por ejemplo, unión a antígeno retenida/mejorada, inmunogenicidad disminuida o ADCC o CDC mejoradas.

[0427] Los aminoácidos generalmente se pueden agrupar según las siguientes propiedades comunes de las cadenas laterales:

- (1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófilo neutro: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácido: Asp, Glu;
- (4) básico: His, Lys, Arg;
- (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

[0428] En algunas formas de realización, las sustituciones conservadoras pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases por otro miembro de la misma clase. En algunas formas de realización, las sustituciones de aminoácidos no conservadoras pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

[0429] Tal como se utilizan en este documento, las formas singulares “un”, “una”, “el” y “ella” incluyen referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, “un” o “una” significa “al menos uno” o “uno o más”. Se entiende que los aspectos y variaciones descritos en el presente documento incluyen “que consisten” y/o “que consisten esencialmente en” aspectos y variaciones.

[0430] A lo largo de esta divulgación, varios aspectos de la materia reivindicada se presentan en un formato de rango. Debe entenderse que la descripción en formato de rango es simplemente por conveniencia y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible del alcance de la materia reivindicada. Por consiguiente, se debe considerar que la descripción de un rango ha revelado específicamente todos los subrangos posibles, así como los valores numéricos individuales dentro de ese rango. Por ejemplo, cuando se proporciona un rango de valores, se entiende que cada valor intermedio, entre el límite superior e inferior de ese rango y cualquier otro valor declarado o intermedio en ese rango declarado está abarcado dentro de la materia reivindicada. Los límites superior e inferior de estos rangos más pequeños pueden incluirse independientemente en los rangos más pequeños, y también están abarcados dentro del objeto reivindicado, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el rango indicado. Cuando el rango indicado incluye uno o ambos límites, los rangos que excluyen uno o ambos límites incluidos también se incluyen en la materia reivindicada. Esto se aplica independientemente de la amplitud del rango.

[0431] El término “aproximadamente”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere al rango de error habitual para el valor respectivo fácilmente conocido por el experto en este campo técnico. La referencia a “acerca de” un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) formas de realización que están dirigidas a ese valor o parámetro per se. Por ejemplo, la descripción que hace referencia a “acerca de X” incluye la descripción de “X”. En ciertas formas de realización, “aproximadamente” un valor indicado se refiere a un valor dentro de $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0,1\%$ o $\pm 0,01\%$ del valor indicado.

[0432] Como se usa en el presente documento, una composición se refiere a cualquier mezcla de dos o más productos, sustancias o compuestos, incluidas las células. Puede ser una solución, una suspensión, un líquido, un polvo, una pasta, acuosa, no acuosa o cualquier combinación de los mismos.

[0433] Como se usa en el presente documento, una afirmación de que una célula o población de células es “positiva” para un marcador particular se refiere a la presencia detectable sobre o dentro de la célula de un marcador particular, típicamente un marcador de superficie. Cuando se hace referencia a un marcador de superficie, el término se refiere a la presencia de expresión en superficie detectada mediante citometría de flujo, por ejemplo, tiñendo con un anticuerpo que se une específicamente al marcador y detectando dicho anticuerpo, en donde la tinción es detectable mediante citometría de flujo a un nivel sustancialmente por encima de la tinción detectada al realizar el mismo procedimiento con un control de isotipo coincidente en condiciones por lo demás idénticas y/o un nivel sustancialmente similar al de las células que se sabe que son positivas para el marcador, y/o un nivel sustancialmente superior a ese para una célula que se sabe que es negativa para el marcador.

[0434] Como se usa en el presente documento, una afirmación de que una célula o población de células es “negativa” para un marcador particular se refiere a la ausencia de una presencia detectable sustancial sobre o dentro de la célula de un marcador particular, típicamente un marcador de superficie. Cuando se hace referencia a un marcador de superficie, el término se refiere a la ausencia de expresión en superficie detectada mediante citometría de flujo, por ejemplo, tiñendo con un anticuerpo que se une específicamente al marcador y detectando dicho anticuerpo, en donde la tinción no se detecta mediante citometría de flujo, a un nivel sustancialmente superior a la tinción detectada al realizar el mismo procedimiento con un control de isotipo coincidente en condiciones por lo demás idénticas, y/o a un

nivel sustancialmente inferior al de las células que se sabe que son positivas para el marcador, y/o a un nivel sustancialmente similar en comparación con el de una célula que se sabe que es negativa para el marcador.

[0435] El término “vector”, como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de propagar otro ácido nucleico al que está unido. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico autorreplicante así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que se ha introducido. Ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de ácidos nucleicos a los que están unidos operativamente. Estos vectores se denominan en el presente documento “vectores de expresión”.

[0436] Los términos “célula huésped”, “línea celular huésped” y “cultivo de células huésped” se usan indistintamente y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluida la progenie de dichas células. Las células huésped incluyen “transformantes” y “células transformadas”, que incluyen la célula transformada primaria y la progenie derivada de la misma sin tener en cuenta el número de pases. La descendencia puede no ser completamente idéntica en contenido de ácido nucleico a una célula madre, pero puede contener mutaciones. Se incluye aquí la progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la seleccionada en la célula originalmente transformada.

VI. EJEMPLOS

[0437] Los siguientes ejemplos se incluyen únicamente con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1: Correlación entre el fenotipo de la composición inicial y la proporción de células que expresan CD4+ a CD8+ CAR en una composición de células T CAR+

[0438] Se generaron composiciones de células T CAR+ que contenían células T autólogas que expresaban un receptor de antígeno quimérico (CAR) a partir de aféresis recolectadas de 11 donantes separados con cuatro muestras de prueba procesadas por separado de cada muestra de donante. Un donante era un paciente con mieloma y los donantes restantes eran sujetos sanos. Después de lavar cada muestra de aféresis, cada muestra se evaluó mediante citometría de flujo para determinar la viabilidad celular usando un marcador apoptótico y la expresión superficial de CD4 y CD8 para determinar la proporción de células T CD4+ a CD8+ viables (proporción CD4/CD8) en cada análisis de muestra de aféresis.

[0439] Se seleccionaron células T CD4+ y CD8+ a partir de muestras de aféresis mediante selección basada en inmunofluorescencia. Se combinaron células T CD4+ y células T CD8+ en una proporción de 1:1 de células CD4+ a CD8+ viables. Se evaluó una muestra de las células combinadas mediante citometría de flujo para determinar la viabilidad celular utilizando un marcador apoptótico específico y la expresión en superficie de marcadores que incluían CD4, CD8, CD45RA y CCR7. Se determinó la relación de CD45RA+/CCR7+CD4+ viable a CD45RA+/CCR7+CD8+ viable (relación CD45RA+/CCR7+ CD4/CD8) en la mezcla de células CD4 y CD8 seleccionadas.

[0440] Para generar una composición de células T CAR+, las células T CD4+ y CD8+ combinadas se activaron mediante incubación con perlas recubiertas de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 en presencia de citocinas, y luego se transdujeron con un vector lentiviral que codifica un anti-BCMA CAR. El CAR contenía un dominio de unión al antígeno scFv específico para BCMA, un espaciador, una región transmembrana CD28, una región de señalización coestimuladora 4-1BB y un dominio de señalización intracelular derivado de CD3-zeta. Después de la transducción, las células se expandieron y luego se congelaron mediante criopreservación. Las células de la composición congelada se descongelaron y se evaluaron mediante citometría de flujo para determinar su viabilidad, expresión superficial de CD4 y CD8 y expresión de CAR utilizando un reactivo BCMA-Fc. Se determinó la proporción de células CAR+ viables que eran CD4+ a células CAR+ viables que eran CD8+ (proporción CAR+ CD4/CD8).

[0441] La proporción CD4/CD8 en las muestras de aféresis, o la proporción CD45RA+/CCR7+ CD4/CD8 en la mezcla de células CD4 y CD8 seleccionadas, se comparó, post facto, con la proporción CAR+ CD4/CD8 en la composición de células CAR-T diseñadas. El grado de correlación de las proporciones medias de cada sujeto se evaluó mediante análisis bivariado y la elipse normal bivariada que representa la región de probabilidad de 0,990 para los datos trazados se muestra en las FIGS. 1A y 1B, respectivamente. La Tabla 1A y la Tabla 1B muestran los resultados de un análisis de correlación de Pearson llevado a cabo con respecto a los datos representados en la FIG. 1A y FIG. 1B, respectivamente.

Tabla 1A: Elipse Normal Bivariada P=0,990; Relación CD4/CD8 en muestra de aféresis

Variable	Media	Des. Est.	Correlación	Prob. Sign.
Relación CD4/CD8 inicial	1,57	0,42	-0,11	0,75
Relación CAR+ CD4/CD8 final	1,35	1,00		

Tabla 1B: Elipse normal bivariada P=0,990; Relación CD45RA+/CCR7+ CD4/CD8 en mezcla de células CD4 y CDS seleccionadas					
Variable	Media	Des. Est.	Correlación	Prob. Sign.	
Relación CD45RA+/CCR7+ CD4/CD8 inicial	1,52	1,09	0,99	<0,0001	
Relación CAR+ CD4/CD8 final	1,35	1,00			

[0442] Como se muestra en la FIG. 1A y la Tabla 1A, en este experimento la proporción CD4/CD8 viable de células T CD4+ y CD8+ de la muestra de aféresis no se correlacionó con la proporción CAR+ CD4/CD8 en la composición final. Este resultado es consistente con las observaciones de que la mezcla de células T CD4 y CD8 purificadas en una proporción de 1:1 antes de la activación basada en el total de células viables no se correlaciona necesariamente con una proporción de 1:1 de células T CD4+ y CD8+ en una composición de células T de salida.

[0443] Como se muestra en la FIG. 1B y la Tabla 1B, en este experimento, la proporción de células T CD4/CD8 CAR+ en la composición final de células T se correlacionó positivamente con la proporción de células T CD4/CD8 de células similares a las originales, según lo determinado por la proporción de CD45RA+/CCR7+ CD4/CD8 en la mezcla de células CD4 y CD8. En particular, los resultados de la FIG. 1B muestran que la correlación entre la proporción de células CD45RA+/CCR7+/CD4+ y células CD45RA+/CCR7+/CD8+ en la muestra inicial y la proporción CAR+ CD4/CD8 en la composición de células T es alta según el coeficiente de correlación de Pearson y el valor de $p < 0,0001$. Esta correlación se mantuvo a pesar de las variaciones en la composición de los insumos y entre las ejecuciones del proceso. Con base en este ajuste de modelo de este conjunto de muestras ejemplar, se determinó una proporción de CD45RA+/CCR7+/CD4+ a CD45RA+/CCR7+/CD8+ de aproximadamente 1,1:1 para dar como resultado una proporción de CAR+ CD4/CD8 de aproximadamente 1:1 en la composición de las células T de salida.

[0444] Estos datos apoyan la hipótesis de que es posible controlar y/o ajustar la proporción y/o composición de células CD4+ y células CD8+ en una composición de células T de salida controlando la proporción de un subconjunto de CD4+ de tipo ingenuo a un CD8+ de tipo ingenuo. Sujeto de células T, tal como lo determina la expresión en superficie de CD45RA+ y CCR7+.

Ejemplo 2: Correlación entre fenotipos de la población de células T inicial y la proporción de células T CAR+CD4+ a células T CAR+CD8+ en composiciones de células T CAR+ diseñadas

[0445] Se generaron un total de 50 composiciones de células T CAR+ diseñadas a partir de muestras de aféresis recolectadas de 15 donantes sanos y un paciente con mieloma múltiple. Para generar las composiciones CAR-T, se combinaron células T CD4+ y CD8+ viables seleccionadas en una composición de células inicial en una proporción de 1:1 y luego se activaron, transdujeron y expandieron como se describe en el Ejemplo 1. Muestras de las composiciones iniciales de CD4+ viables combinadas y las células T CD8+ se evaluaron mediante citometría de flujo para determinar su viabilidad y la expresión en superficie de marcadores que incluían CD4, CD8, CD27, CD45RA, CCR7 y CD62L.

[0446] Se evaluaron muestras de las composiciones de células T CAR+ diseñadas para determinar la expresión de CAR y la expresión en superficie de marcadores que incluían CD4 y CD8. Se calcularon los promedios para las proporciones de células T CD4+CAR+ a células CD8+CAR+T (proporción CAR+ CD4/CD8) de composiciones de células T CAR+ individuales del mismo donante que se generaron usando el mismo proceso ejemplar que se describe en el Ejemplo 1, excepto que se variaron ciertos parámetros del proceso. Se analizaron las proporciones CAR+ CD4/CD8 promedio para determinar correlaciones con diversos fenotipos de las composiciones iniciales de células CD4+ a CD8+ viables combinadas. La combinación de las células T CD4+ y CD8+ seleccionadas en una proporción de 1:1 antes de la activación no se correlacionaba necesariamente con una proporción de 1:1 CAR+ CD4/CD8 en las composiciones de células de salida generadas.

[0447] El grado de correlación entre las proporciones promedio CAR+ CD4/CD8 y los fenotipos de cada donante se evaluó mediante análisis bivariado. Las elipses normales bivariadas que representan la probabilidad de 0,950 se muestran para las proporciones de células T CD45RA+/CCR7+/CD4+ a CD45RA+/CCR7+/CD8+ (proporción CD45RA+/CCR7+ CD4/CD8; FIG. 2A); CD62L/CCR7+/CD4+ a CD62L/CCR7+/CD8+ (relación CD62L-/CCR7+ CD4/CD8; FIG. 2B); y relación CD27+/CCR7+/CD4+ a CD27+/CCR7+/CD8+ (relación CD27+/CCR7+ CD4/CD8; FIG. 2C). La Tabla 2 muestra los resultados del análisis de correlación de Pearson llevado a cabo con respecto a los datos representados en las FIGS. 2A-2C.

Tabla 2: Elipse Normal Bivariada P=0,950 para fenotipos ejemplares					
Fenotipo	Media	Des. Est.	Correlación	Prob. Sign.	Número
Relación CD45RA+/CCR7+ CD4/CD8	1,14	0,56	0,88	<0,0001	16
% Relación CD62L-/CCR7+ CD4/CD8	1,66	0,83	0,88	<0,0001	16
% Relación CD27+/CCR7+ CD4/CD8	2,01	0,91	0,93	<0,0001	16
Relación CAR+ CD4/CD8 de salida	1,22	0,80			

[0448] El análisis indicó que usando el protocolo ejemplar descrito en el Ejemplo 1, la proporción de células T CAR+ CD4/CD8 se correlacionaba positivamente con la proporción de células T CD45RA+/CCR7+ CD4/CD8 para donantes sanos pero, en este experimento, no para la muestra de un paciente. Se demostró que la proporción CAR+ CD4/CD8 se correlaciona positivamente con las proporciones CD62L-/CCR7+ CD4/CD8 y CD27+/CCR7+ CD4/CD8 en composiciones celulares iniciales de muestras tanto de donantes sanos como de pacientes. Con base en el ajuste del modelo, se calculó que se predecía que una proporción inicial de CD27+/CCR7+ CD4/CD8 de 1,69:1 generaría una composición de células de salida con una proporción CAR+ CD4/CD8 de aproximadamente 1:1. Estos resultados fueron consistentes con el hallazgo de que la proporción CD27+CCR7+ CD4/CD8 se puede ajustar en la composición de células inicial para controlar y/o predecir la proporción CAR+ CD4/CD8 resultante de la composición de células diseñada.

Ejemplo 3: Proceso para producir una composición de células T CAR+ basada en el fenotipo de la composición inicial

[0449] Se generaron diez composiciones de células T CAR+ que contenían células T autólogas que expresaban un CAR a partir de aféresis recolectadas de 3 donantes separados, incluidos dos donantes sanos y un paciente con mieloma múltiple. Se seleccionaron células T CD4+ y CD8+ a partir de muestras de aféresis como se describe en el Ejemplo 1. Las muestras de aféresis y las células T CD4+ y CD8+ seleccionadas se evaluaron mediante citometría de flujo para determinar su viabilidad y marcadores de superficie, incluidos CD27, CCR7, CD4 y CD8. Se determinó la frecuencia de células CD27+/CCR7+ entre las células T CD4+ y CD8+ seleccionadas, y cada donante exhibió una proporción diferente de células CD27+/CCR7+ CD4+ a células CD27+/CCR7+ CD8+ en muestras de aféresis. Por ejemplo, la muestra del paciente exhibió una proporción de células CD27+/CCR7+ CD4+ a células CD27+/CCR7+ CD8+ de aproximadamente 12,2:1, mientras que las dos muestras de donantes sanos exhibieron proporciones de células CD27+/CCR7+ CD4+ a células CD27+/CCR7+ CD8+ de 3,56:1 y 2,15:1. Las composiciones de células de entrada se generaron ya sea (1) combinando células CD4+ y CD8+ seleccionadas en una proporción de CD4+ a CD8+ viable de 1:1 (CD4+/CD8 viable) o (2) combinando células CD4+ y CD8+ en una proporción de 1,69:1 de células CD27+/CCR7+ CD4+ y células CD27+/CCR7+ CD8+ (CD27+/CCR7+ CD4/CD8) antes de la activación. Se activaron, transdujeron y expandieron un total de 300×10^6 células o 100×10^6 células de las composiciones de entrada para generar composiciones de células de salida sustancialmente como se describe en el Ejemplo 1.

[0450] No se observó que el número total de células en el paso de activación afectara la proporción CAR+ CD4/CD8. Las composiciones de células de salida generadas a partir de composiciones iniciales que contienen células CD27+/CCR7+, CD4/CD8 mezcladas en una proporción de aproximadamente 1,69:1, incluso a partir de la muestra del paciente, exhibieron proporciones CAR+CD4/CD8 que eran cercanas a la proporción objetivo deseada de 1:1 (por ejemplo, entre aproximadamente 1,86:1 y 1:1,86). Las composiciones de células de salida generadas a partir de composiciones de entrada que contienen células CD4/CD8 viables mezcladas en una proporción de 1:1 mostraron una mayor variación en las proporciones CAR+ CD4/CAR+ CD8, en comparación con las composiciones generadas a partir de composiciones de entrada que contienen células CD4+ y CD8+ en una proporción de 1,69:1 de células CD27+/CCR7+ CD4+ y células CD27+/CCR7+ CD8+. En este experimento, las composiciones de salida generadas utilizando material del paciente en un proceso ejemplar exhibieron proporciones CAR+ CD4/CAR+ CD8 de aproximadamente 7,6 y 8,6 cuando se activaron 100×10^6 células o 300×10^6 células, respectivamente. Cuando se mezclaron según el fenotipo en un proceso similar, por ejemplo una proporción de 1,69:1 de células T CD27+CCR7+ CD4+: CD27+CCR7+ CD8+, la proporción final CAR+ CD4/CAR+ CD8 fue de 1,6 y 1,3 cuando se mezclaron 100×10^6 células o 300×10^6 células, activados, respectivamente. Estos resultados son consistentes con el hallazgo de que fenotipos particulares, por ejemplo, células CD27+/CCR7+, pueden correlacionarse con las proporciones CAR+ CD4/CAR+ CD8 resultantes en composiciones producidas generadas a partir de muestras tanto de donantes sanos como de pacientes.

Ejemplo 4: Evaluación de muestras de sujetos enfermos de la correlación entre el fenotipo de la composición inicial y la proporción de células que expresan CD4+ a CD8+ CAR en una composición de células T CAR+

[0451] Se generaron composiciones de células T CAR+ que contenían células T autólogas que expresaban un receptor de antígeno quimérico (CAR) a partir de aféresis recolectadas de 7 donantes separados con mieloma múltiple.

[0452] Se seleccionaron células T CD4+ y CD8+ a partir de muestras de aféresis mediante selección basada en inmunofluorescencia. Se combinaron células T CD4+ y células T CD8+ en una proporción de 1:1 de células CD4+ a CD8+ viables. Se evaluó la expresión superficial de marcadores que incluían CD4, CD8, CD27, CD45RA, CCR7 y CD62L en una muestra de células combinadas. En la mezcla de células CD4 y CD8 seleccionadas, se determinó la proporción de los siguientes fenotipos celulares (1) células CD27+/CCR7+ CD4+ a células CD27+/CCR7+ CD8+ (proporción CD27+/CCR7+ CD4/CD8), (2) CD45RA+/CCR7+ CD4+ células a células CD45RA+/CCR7+ CD8+ (proporción CD45RA+/CCR7+ CD4/CD8), y (3) células CD62L-/CCR7+ CD4+ a células CD62L-/CCR7+ CD8+ (proporción CD62L-/CCR7+ CD4/CD8).

[0453] Se generó una composición de células T CAR+ que expresaba un CAR anti-BCMA usando el proceso sustancialmente como se describe en el Ejemplo 1, incluyendo activación, transducción, expansión y criopreservación de las células generadas. Las células de la composición congelada se descongelaron y se evaluaron mediante

citometría de flujo para determinar su viabilidad, expresión superficial de CD4 y CD8 y expresión de CAR utilizando un reactivo BCMA-Fc. Se determinó la proporción de células CAR+ viables que eran CD4+ con respecto a células CAR+ viables que eran CD8+ (proporción CAR+ CD4/CD8).

[0454] La relación CD27+/CCR7+ CD4/CD8, la relación CD45RA+/CCR7+ CD4/CD8, o la relación CD62L/CCR7+ CD4/CD8 en la mezcla de células CD4 y CD8 seleccionadas, se comparó, post facto, con la relación CAR+ CD4/CD8 en la composición de células CAR-T diseñada. El grado de correlación de las proporciones medias de cada sujeto se evaluó mediante elipse normal bivariada que representa la región de probabilidad de 0,950 para los datos trazados que se muestran en las **FIGS. 3A-3C**. Como se muestra, fue significativa una correlación entre la proporción CD27+/CCR7+ CD4/CD8, la proporción CD45RA+/CCR7+ CD4/CD8 o la proporción CD62L-/CCR7+ CD4/CD8 en la muestra inicial con la proporción CAR+ CD4/CD8 en la composición de células T basada en el análisis de correlación de Pearson. Las **Tablas 3A-3C** muestran los resultados del análisis de correlación llevado a cabo con respecto a los datos representados en las **FIGS. 3A-3C**. La significancia <0,05 se indica con *.

Tabla 3A: Elipse Normal Bivariada P=0,950; relaciones CD4/CD8 en composición de muestra de inicio y células de salida

Variable	Media	Des. Est.	Correlación	Prob. Sign.
Relación %CD27+CCR7+ CD4/CD8 inicial	2,689438	1,788478	0,895786	0,0064*
Relación CAR+ CD4/CD8	2,560108	2,459516		

Tabla 3B: Elipse Normal Bivariada P=0,950; relaciones CD4/CD8 en composición de muestra de inicio y células de salida

Variable	Media	Des. Est.	Correlación	Prob. Sign.
Relación %CD45RA+CCR7+ CD4/CD8 inicial	1,394018	0,937173	0,86723	0,0115*
Relación CAR+ CD4/CD8	2,560108	2,459516		

Tabla 3C: Elipse Normal Bivariada P=0,950; relaciones CD4/CD8 en composición de muestra de inicio y células de salida

Variable	Media	Des. Est.	Correlación	Prob. Sign.
Relación %CD62L-CCR7+ CD4/CD8 inicial	2,179702	1,153181	0,88584	0,0079*
Relación CAR+ CD4/CD8	2,560108	2,456516		

[0455] No se pretende que el alcance de la presente invención esté limitado a las formas de realización particulares reveladas, que se proporcionan, por ejemplo, para ilustrar diversos aspectos de la invención. Varias modificaciones a las composiciones y métodos descritos resultarán evidentes a partir de la descripción y enseñanzas del presente documento.

SECUENCIAS

[0456]

#	SECUENCIA	ANOTACIÓN
1	ESKYGPPCPFCF	espaciador (bisagra IgG4) (aa) Homo Sapiens
2	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCCTTGCCT	espaciador (bisagra IgG4) (nt) Homo Sapiens
3	ESKYGPPCPFCFPGQPREPQVYTLPPSQEEMTHQVSLTCLVKGFPYPSUIAV EWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSELTVDKSRWQEGNVFSCSEVMHE ALHNNHTQKSLSLSLGK	espaciador bisagra-CH3 Homo Sapiens
4	ESKYGPPCPFCFPAPEFLGGFSVFLPPPKPKDTLMISRTFEVTCVVVDVSDQE DPEVQGFNMYVDGVEVMNAKTKPRDQFNSTYRVVSVLTVLRQDKWLNQKEYK CKVSHNGLPSSLEKTKSKAKGQPREPQVYTLSPSQEEMTHQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSELTVDKSRWQEGNV FSCSEVMHEALHNNHTQKSLSLSLGK	espaciador bisagra-CH2- CH3 Homo Sapiens
5	EWPESPKAGASSVPTAQPOAEGSLAKATTAPATTNTTGGCGEEKKKKEKEKE EQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLUTPAVQDLNLBDKATFTCFVVGSDLKDA HLTWEVAGSKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQHSLTLPRSLWNAQTSTVCTL NHPSLFPQRLMALKEPAAQAPVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPP NILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPGPGSTTFWANSVLAVFAFPSPQPATY TCVVSHEDESRLLNASHSLLEVSYVTDH	IgD-bisagra- Fc Homo sapiens
6	LEGGGEGRSLLTCGDEVENPGPR	T2A artificial
7	MLLLVYSLLICELPHFAFLIPKVCNGIGICEPKOSLSINATNINHFRC TSISGDLNHLPAVAFKGDSTNTTFFLDQQLDILKTVEITGFLLIQAMPEN RTDLHAFENLSIINGRTKQNGQFSLAVVSLNITSLGLASLKEISDGDVLIIS GHENLCYANTINWGLPGTSGQTKIISNKGEMACKATGQVCHALCSPEGC WGPEPRDCVSCNVSNGRECVDKCNLLEGEPRAEFVENSECIQCHPECLFQA MNTTCGGRGPFENCICAHYIDGPHCVETCPAGVMEENNTLVWVEYADAGHVC HLCHPNCITYGCTGPGLEGCPYKPKIPSIATOMVGAALLLLLVVALGIGLPM	TEGPR artificial
8	FWVLVVVGGLVACYSLLVTVAFTIIPWV	CD28 (amino ácidos 153- 179 de adhesión n.º P10747) Homo sapiens
9	IEVMYPPPYLDWEKSNGTIINVKGNHLCPSLFPGPSKP FWVLVVVGGLVACYSLLVTVAFTIIPWV	CD28 (amino ácidos 114- 179 de adhesión n.º P10747) Homo sapiens
10	RSKRSELLHSYDDEETPRAPGPTREHYQFYAPPRDFAAYS	CD28 (amino ácidos 180-

(Continuación)

		220 de P10747) Homo sapiens
11	RSKRPSRGHSDYMEETFRAPGPTRKHVQFYAPPRDFAAYRS	CD28 (II a GG) Homo Sapiens
12	MRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQZEDGCSCRFPEZZEGGCEL	4-1BB (amino ácidos 214- 255 de Q97011.1) Homo Sapiens
13	RVKFPRSADAPAYQQGQNLVNEMLGRREYDVLDKRRGRDPFEMGGKPRK KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGNGHDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQALPFR	CD3 zeta Homo sapiens
14	RVKFPRSADAPAYQQGQNLVNEMLGRREYDVLDKRRGRDPFEMGGKPRK KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGNGHDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQALPFR	CD3 zeta Homo sapiens
15	RVKFPRSADAPAYQQGQNLVNEMLGRREYDVLDKRRGRDPFEMGGKPRK KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGNGHDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQALPFR	CD3 zeta Homo sapiens
16	RRVCNGIGIGICEFKDLSINATNIPHFNCTSTISGDLHLFPVAFRGDSPTHT PFELDPQELDILKTVKEITGFLIQAWFENKTDLHAFENLEIIRGRFKQHQGQ FSLAVVSLNITSLSGLASLKEISDGOVVISGNKMLCYANTINWEKLFQTSQQ NTRKIIISNAGEENSCKATGQVCHALCSPEGCWGFPEPROCVSCKNVSAGRECV KCNLLAGEPREFVENSECIQCNPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCARVIDG PHCVKTCFAGVMGENWTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCCTGPGLEGCPN GPKIPSIATCMVGAIIILLLVVALGIGLPM	teGRF artificial
17	EGRGSLITCGOVEENPGF	T2A artificial
18	PLGLWA	Enlazador escindible HMF
19	GSGATNFSLLKQAGOVEENPGF	F2A
20	ATNFSLLKQAGOVEENPGF	F2A
21	QCTNYALLKLAGOVEENPGF	F2A
22	VKQTLNFDLLKLAGOVEENPGF	F2A
23	X1FPX2P X1 es glicina, cisteína o arginina X2 es cisteína o treonina	Bisagra
24	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro	Bisagra
25	Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro	Bisagra
26	ELKTPADTHTCFACPEPKSCDTFPFPCFACPEPKSCDTFPFPCFACPEPKSC DTFPFPCFACF	Bisagra
27	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro	Bisagra
28	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Bisagra
29	Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Bisagra

(Continuación)

5	30	Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Eisagra
	31	Glu Val Val Val Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Eisagra
10	32	-FGGG- (SGGG) S-F- en donde F es prolina, G es Glicina y S es serina	Secuencia de enlazador ejemplar
	33	GSADDAKKDAAKKDGKS	Secuencia de enlazador ejemplar
15	34	QQGNTLPYT	FMC63 LC-CDR3
	35	RASQDIERYLN	FMC63 CDR L1
	36	SRLHGGV	FMC63 CDR L2
20	37	GNTLPYTFG	FMC63 CDR L3
	38	DYGVN	FMC63 CDR H1
	39	VINGSETTYNSALKS	FMC63 CDR H2
25	40	YANDYWG	FMC63 CDR H3
	41	EVKLQESGFLVAFPSQSLSVTCTVSGVSLFDYGVSWIPQPFENGLEWLGVIWSETTYNSALKSRLTIIKDNKSKQVFLKQNSLQTDDETAIYYCAKHYYYGGSYANDYWGQGTSTVTVSS	FMC63 VH
30	42	DIQMTQTTSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLWYQKPGDGVKLLIYHTSRLMSGVPSRPFSGSGGSDTYSLTISNLEQEDLATYFCQGGNTLPYTFGGGTHLEIT	FMC63 VL
	43	DIQMTQTTSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLWYQKPGDGVKLLIYHTSRLMSGVPSRPFSGSGGSDTYSLTISNLEQEDLATYFCQGGNTLPYTFGGGTHLEITGGTSGSGKPGSGGGSTFGEVKLQESGFLVAFPSQSLSVTCTVSGVSLFDYGVSWIPQPFENGLEWLGVIWSETTYNSALKSRLTIIKDNKSKQVFLKQNSLQTDDETAIYYCAKHYYYGGSYANDYWGQGTSTVTVSS	FMC63 scFv
35	44	KASQNVGTNVA	SJ25C1 CDR L1
	45	SATYPNS	SJ25C1 CDR L2
40	46	QQYNRYFYT	SJ25C1 CDR L3
	47	SYWNI	SJ25C1 CDR H1
	48	QIYFGGGDTNYNGKFRG	SJ25C1 CDR H2
45	49	KTISSVVDYFYDY	SJ25C1 CDR H3
	50	EVKLQQSGAELNRFPGSEVKISCKASGYAFSSYWMRWVKRPGQGLEWIGQIYFGGDTNYNGKFRGQATLTADKSSSTAYNQLSGLTSEDSAVYFCARHTISSVVDYFYDYWGQGTSTVTVSS	SJ25C1 VH
50	51	DIELTQSPKPMSTFVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVFDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGQTKLEIKR	SJ25C1 VL
	52	GGGGSGGGSGGGGG	Enlazador
55	53	EVKLQQSGAELNRFPGSEVKISCKASGYAFSSYWMRWVKRPGQGLEWIGQIYFGGDTNYNGKFRGQATLTADKSSSTAYNQLSGLTSEDSAVYFCARHTISSVVDYFYDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGSGGGGGDIELTQSPKPMSTFVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVFDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGQTKLEIKR	SJ25C1 scFv
60	54	RYYYGGEYANDY	FMC63 HC-CDR3

(Continuación)

5	55	RTSKLNS	FMC63 LC- CDR2
	56	GSTSGAGKFGSGEGSTEG	Enlazador
10	57	gacatccagatgacccagaccacctccagcctgagcgccagcctggggcgaccgggt gaccatcagctgcggggccagccaggacatcagcaagtaoctgaactgggtatcagc agaagcccgacggcacccgtcaagctgctgatctaccacaccagccggctgcacagc ggcgtgcccagccgggttagcggcagcggctccggcacccgactacagcctgaccat ctccaaacctggaacaggaagatatcgccacctacttttgccagcaggggaacacac tgcctacacactttggcgggcggaacaaagctggaaatcacccggcagcacctccggc agcggaagccctggcagcggcgaggggcagcaccagggcgagggtgaagctgcagga aagcggcctggcctgggtggccccccagccagagcctgagcgtgacctgcacccgtga ggggcgtgagcctgcccgaactacggcgtgagctggatccggcagccccccagggaag ggcctggaatggctgggcgtgatctggggcagcgsagccacctaactacaacagcgc cctgaagagccggctgaccatcatcaaggacaacagcaagagccagggtgttccatga agatgaacagcctgcagacccagacacccgcaatctaactactggcccaagcaatac tactacggcggcagctacgcctaggactactggggccagggaaccagcgtgacccgt gagcagc	scFV codificador de secuencia
15			
20			

REIVINDICACIONES

1. Un método para generar una composición de células, comprendiendo el método:

(a) combinar una primera composición de células que comprende células T CD4+ de tipo ingenuo con una segunda composición de células que comprende células T CD8+ de tipo ingenuo para producir una composición de células de entrada en la que la proporción de células T CD4+ de tipo ingenuo a células T CD8+ de tipo ingenuo están entre 0,8:1 y 2,2:1, inclusive,

en el que la proporción se ha determinado basándose en el número, el número por volumen, el número por peso o el porcentaje de células T CD4+ similares a las originales en la primera composición de células y el número, número por volumen, número por peso o porcentaje de células T CD8+ de tipo ingenuo en la segunda composición de células,

en el que las células CD4+ de tipo ingenuo:

(i) son positivas en superficie para CD45RA y CCR7;

(ii) son CD27 y CCR7 positivos en superficie; o

(iii) son positivas en superficie para CCR7 y negativas en superficie para CD62L; y en el que las células CD8+ de tipo ingenuo:

(i) son positivas en superficie para CD45RA y CCR7;

(ii) son CD27 y CCR7 positivos en superficie; o

(iii) son positivas en superficie para CCR7 y negativas en superficie para CD62L; y

(b) poner en contacto la composición de células de entrada con un agente que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un receptor recombinante en condiciones para introducir la molécula de ácido nucleico que codifica el receptor recombinante en las células de la composición de células de entrada.

2. El método de la reivindicación 1, en el que la primera composición de células se produce aislando células T CD4+ de una muestra biológica obtenida de un sujeto y/o la segunda composición de células se produce aislando células T CD8+ de la muestra biológica obtenida del sujeto.

3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que, antes de la combinación, el método comprende determinar el número, número por volumen, número por peso o porcentaje de células T CD4+ de tipo ingenuo en la primera composición de células y/o el número, número por volumen, número por peso o porcentaje de células T CD8+ de tipo ingenuo en la segunda composición de células, opcionalmente en donde el número, número por volumen, número por peso o porcentaje de células T CD4+ de tipo ingenuo y/o el número, número por volumen, número por peso o porcentaje de células T CD8+ de tipo ingenuo se determinan mediante citometría de flujo.

4. El método de la reivindicación 2, en el que, antes de la combinación, el método comprende determinar el número, el número por volumen, el número por peso o el porcentaje de células T CD4+ de tipo ingenuo y/o el número, el número por volumen, número por peso, o porcentaje de células T CD8+ de tipo ingenuo en la muestra biológica del sujeto, opcionalmente en donde el número, número por volumen, número por peso, o porcentaje de células T CD4+ de tipo ingenuo y/o el número, número por volumen, el número por peso o el porcentaje de células T CD8+ de tipo ingenuo se determina mediante citometría de flujo.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la proporción de células T CD4+ de tipo ingenuo a células T CD8+ de tipo ingenuo en la composición de células de entrada se ajusta o altera en comparación con la proporción de células T CD4+ de tipo ingenuo a células T CD8+ similares a las normales en la muestra biológica del sujeto.

6. El método de la reivindicación 1, comprendiendo el método:

(1) determinar el número, número por volumen, número por peso o porcentaje de células T CD4+ de tipo ingenuo y células T CD8+ de tipo ingenuo en una muestra biológica obtenida de un sujeto o en una o más muestras derivadas del mismo, opcionalmente en donde el número, número por volumen, número por peso o porcentaje de células T CD4+ de tipo ingenuo y/o el número, número por volumen, número por peso o porcentaje de células T CD8+ se determinan mediante citometría de flujo;

(2) producir una composición de células de entrada que comprende células T CD4+ y células T CD8+ en la que la proporción de células T CD4+ de tipo ingenuo a células T CD8+ de tipo ingenuo está entre 0,8:1 y 2,2:1, inclusive, en la que las células T CD4+ de tipo ingenuo:

(i) son positivas en superficie para CD45RA y CCR7;

(ii) son positivas en superficie para CD27 y CCR7; o

(iii) son positivas en superficie para CCR7 y negativas en superficie para CD62L; y en el que las células CD8+ de tipo ingenuo:

- 5 (i) son positivas en superficie para CD45RA y CCR7;
(ii) son positivas en superficie para CD27 y CCR7; o
(iii) son positivas en superficie para CCR7 y negativas en superficie para CD62L;

en el que la proporción en la composición de células de entrada se ajusta o altera en comparación con la proporción de células T CD4+ de tipo ingenuo a células T CD8+ de tipo ingenuo en la muestra biológica del sujeto; y

- 10 (3) poner en contacto la composición de células de entrada con un agente que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un receptor recombinante en condiciones para introducir el ácido nucleico que codifica el receptor recombinante en las células de la composición de células de entrada.

- 15 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende además estimular las células, antes, durante y/o después de dicho contacto, en el que la estimulación comprende incubar las células en presencia de uno o más agentes estimulantes, en el que el estimulante da como resultado la activación y/o proliferación de las células.

- 20 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que las células CD4+ de tipo ingenuo y/o las células CD8+ de tipo ingenuo tienen una superficie positiva para CD45RA, CD27 y CCR7 y una superficie negativa para CD45RO.

- 25 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la composición de células de entrada comprende una proporción de células CD4+ de tipo ingenuo a células CD8+ de tipo ingenuo de entre 0,8:1 y 2,0:1, 0,8:1 y 1,6:1, 0,8:1 y 1,4:1, 0,8:1 y 1,2:1, 1,5:1 y 2:1, 1,6:1 y 1,8:1, o 1,0:1 y 1,2:1, cada uno inclusive opcionalmente 2:1, 1,9:1, 1,8:1, 1,7:1, 1,69:1, 1,6:1, 1,5:1, 1,4:1, 1,3:1, 1,2:1, 1,1:1 o 1,0:1, adicionalmente opcionalmente, 1,1:1.

10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 -8, en el que la composición de células de entrada comprende:

- 30 (i) una proporción de células CD45RA+CCR7+CD4+ de tipo ingenuo a células CD45RA+CCR7+CD8+ de tipo ingenuo de 1,1:1; o
(ii) una proporción de células CD27+CCR7+CD4+ de tipo ingenuo a células CD27+CCR7+CD8+ de tipo ingenuo de 1,69:1.

- 35 11. El método de 1-9, en el que la composición de células de entrada comprende una proporción de células CD62L-CCR7+CD4+ a células CD62L-CCR7+CD8+ de o aproximadamente 1,2:1, 1,1:1, 1,0:1, 0,9:1 u 0,8:1.

- 40 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2-11, en el que la muestra biológica es o se obtiene a partir de una muestra de sangre, plasma o suero, opcionalmente en el que la muestra biológica es o comprende una muestra de sangre completa, una muestra de capa leucocitaria, una muestra de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), una muestra de células T no fraccionadas, una muestra de linfocitos, una muestra de glóbulos blancos, un producto de aféresis o un producto de leucoféresis, además opcionalmente en donde la muestra biológica es o se obtiene de una muestra de aféresis o leucoféresis.

- 45 13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que la composición de células de entrada comprende:

- 50 (i) desde o desde aproximadamente 1×10^7 a 5×10^9 células totales o células T totales, desde o desde aproximadamente 5×10^7 a 1×10^9 células totales o células T totales, desde o desde aproximadamente 1×10^8 a 5×10^8 células totales o células T totales, o desde o desde aproximadamente 2×10^8 a 5×10^8 células totales o células T totales, o poblaciones viables de cualquier de lo anterior; y/o
(ii) al menos o al menos aproximadamente 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 o 5×10^8 células totales o células T totales o una población viable de cualquiera de los anteriores.

- 55 14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 7-13, en el que:

- (i) el uno o más agentes estimulantes son capaces de activar células T, células T CD4+ y/o células T CD8+; es capaz de inducir una señal a través de un complejo TCR; y/o es capaz de inducir la proliferación de células T, células T CD4+ y/o células T CD8+;
60 (ii) el uno o más agentes estimulantes comprende un agente primario que se une a un miembro de un complejo de TCR, opcionalmente que se une específicamente a CD3, opcionalmente en donde el uno o más agentes estimulantes comprende además un agente secundario que se une específicamente a una célula T molécula coestimuladora, además opcionalmente en la que:

- 65 (A) la molécula coestimuladora se selecciona del grupo que consiste en CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 o ICOS; y/o

(B) los agentes primarios y secundarios comprenden anticuerpos, opcionalmente en donde uno o más agentes estimulantes comprenden la incubación con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28;

(iii) uno o más agentes estimulantes están presentes en la superficie de un soporte sólido, opcionalmente una perla, además opcionalmente una perla paramagnética; y/o

(iv) uno o más agentes estimulantes se seleccionan del grupo que consiste en moléculas de unión a CD3; moléculas de unión a CD28; IL-2 recombinante; IL-15 recombinante; e IL-7 recombinante, una vacuna que comprende un antígeno específicamente reconocido por el receptor de antígeno y un anticuerpo antiidiotipo que se une específicamente al receptor de antígeno o combinaciones de los mismos.

15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 7-14, en donde la incubación se lleva a cabo para:

(i) de 2 a 15 días, de 2 a 12 días, de 2 a 12 días, de 2 a 8 días, de 2 a 6 días, de 2 a 4 días, 4 a 12 días, 4 a 10 días, 4 a 8 días, 4 a 6 días, 6 a 12 días, 6 a 10 días, 6 a 8 días, 8 a 12 días, 8 a 10 días o 10 a 12 días; y/o

(ii) al menos o aproximadamente al menos o 4 días, 6 días, 8 días, 10 días o 12 días.

16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en el que el agente que comprende la molécula de ácido nucleico es un vector viral o es un transposón, opcionalmente en el que el agente que comprende la molécula de ácido nucleico es un vector viral y el vector viral es un vector retroviral, además opcionalmente en donde el vector viral es un vector lentiviral o un vector gammaretroviral.

17. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en el que el receptor recombinante es capaz de unirse a un antígeno diana que está asociado, es específico y/o se expresa en una célula o tejido de una enfermedad, trastorno o afección, opcionalmente en el que:

(i) la enfermedad, trastorno o afección es una enfermedad o trastorno infeccioso, una enfermedad autoinmune, una enfermedad inflamatoria, un tumor o un cáncer;

(ii) el antígeno diana es un antígeno tumoral; y/o

(iii) el antígeno diana se selecciona entre el receptor huérfano tipo tirosina quinasa 1 (ROR1), el antígeno de maduración de células B (BCMA), la anhidrasa carbónica 9 (CA9, también conocida como CAIX o G250), Her2/neu (receptor tirosina quinasa erbB2), CD19, CD20, CD22, mesotelina (MSLN), antígeno carcinoembrionario (CEA) y antígeno de superficie de la hepatitis B, receptor antifolato, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, proteoglicano sulfato de condroitina 4 (CSPG4), EGFR, glicoproteína epitelial 2 (EPG-2), glicoproteína epitelial 40 (EPG-40), receptor de efrina A2 (EPHa2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), dímeros de erbB, tipo III mutación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR VIII), proteína de unión a folato (FBP), receptor de Fc tipo 5 (FCRL5, también conocido como homólogo 5 del receptor de Fc o FCRH5), receptor de acetilcolina fetal (AChR fetal), gangliósido GD2, gangliósido GD3, humano antígeno leucocitario A1 (HLA-A1), antígeno leucocitario humano A2 (HLA-A2), receptor alfa de IL-22 (IL-22Ra), receptor de dominio de inserción de quinasa (kdr), cadena ligera kappa, repetición rica en leucina que contiene 8 miembros de la familia A (LRRRC8A), Lewis Y, molécula de adhesión de células LI (LI-CAM), antígeno asociado al melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, antígeno de melanoma expresado preferentemente (PRAME), survivina, glicoproteína 72 asociada a tumores (TAG72), B7-H3, B7-H6, receptor alfa 2 de IL-13 (IL-13Ra2), antígeno asociado al melanoma humano de alto peso molecular (HMW-MAA), CD171, receptor alfa de folato, CD44v7/8, integrina $\alpha v \beta 6$ (integrina $\alpha v \beta 6$), 8H9, molécula de adhesión de células neurales (NCAM), receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (receptores VEGF o VEGFR), glicoproteína del trofoblasto (TPBG también conocida como 5T4), ligandos NKG2D, CD44v6, antígeno dual, un antígeno de cáncer de testículo, citomegalovirus murino (CMV), mucina 1 (MUC1), MUC16, antígeno de células madre de próstata (PSCA), antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), ligandos del miembro D del grupo 2 del asesino natural (NKG2D), antígeno 1B de cáncer/testículo (CTAG, también conocido como NY-ESO-1 y LAGE-2), melan A (MART-1), glicoproteína 100 (gp100), glipican-3 (GPC3), receptor acoplado a proteína G 5D (GPRC5D), antígeno oncofetal, TAG72, proteína 1 relacionada con la tirosinasa (TRP1, también conocida como TYRP1 o gp75), proteína 2 relacionada con la tirosinasa (TRP2, también conocida como dopacromo tautomerasa, dopacromo delta isomerasa o DCT), receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)-R2, antígeno carcinoembrionario (CEA), receptor de estrógeno, receptor de progesterona, un antígeno prostático específico, efrina B2, CD123, CD133, c-Met, GD2 O-acetilado (OGD2), epítipo CE7 de L1-CAM, tumor de Wilms 1 (WT-1), una ciclina, ciclina A2, ligando de quimiocina 1 con motivo C-C (CCL-1), CD138, un antígeno específico de patógeno o antígeno expresado por patógeno y un antígeno asociado con una etiqueta universal.

18. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en el que el receptor recombinante:

(i) es o comprende un receptor de antígeno no TCR funcional o un TCR o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y/o

(ii) es un receptor de antígeno quimérico (CAR).

19. El método de la reivindicación 18, en el que el CAR comprende:

(i) un dominio extracelular que comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno; opcionalmente en el que el dominio de unión al antígeno es o comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo, que además opcionalmente es un fragmento de cadena única; y
(ii) un dominio de señalización intracelular que comprende un ITAM; opcionalmente en el que:

- (a) el dominio de señalización intracelular es o comprende un dominio de señalización intracelular de una cadena CD3, opcionalmente una cadena CD3-zeta (CD3), o un puerto de señalización de la misma; y/o
- (b) la región de señalización intracelular comprende además una región de señalización coestimuladora; opcionalmente un dominio de señalización intracelular de una molécula coestimuladora de células T o una parte de señalización de la misma, y/o un dominio de señalización intracelular de un CD28, un 4-1BB o un ICOS o una parte de señalización del mismo.

20. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-19, en el que el método produce una composición de salida en la que la proporción de células T CD4+ que expresan receptores recombinantes a células T CD8+ que expresan receptores recombinantes, opcionalmente la proporción de células viables de las mismas está entre al menos o aproximadamente 0,5:1 y 2:1 o 0,8:1 y 1,6:1 o 1:1 y 1,5:1, cada uno inclusive, además opcionalmente en donde:

- (i) la relación de células T CD4+ que expresan receptores recombinantes a células T CD8+ que expresan receptores recombinantes, opcionalmente la proporción de células viables de las mismas, en la composición de salida es o es aproximadamente 1,2:1, 1,1:1, 1:1, 0,9:1 o 0,8:1; y/o
- (ii) la proporción de células T CD4+ que expresan receptores recombinantes a células T CD8+ que expresan receptores recombinantes, opcionalmente la proporción de células viables de las mismas, en la composición de salida es o es aproximadamente 1:1.

FIG. 1A

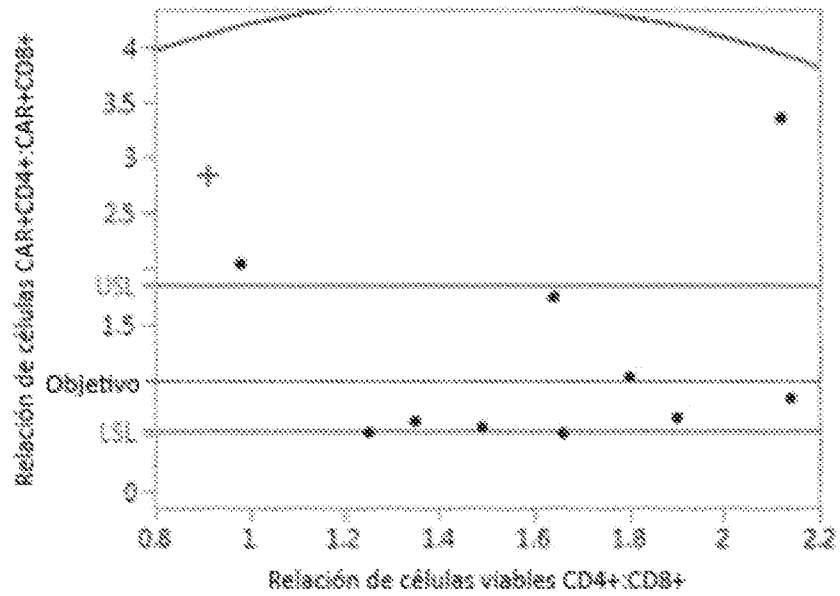


FIG. 1B

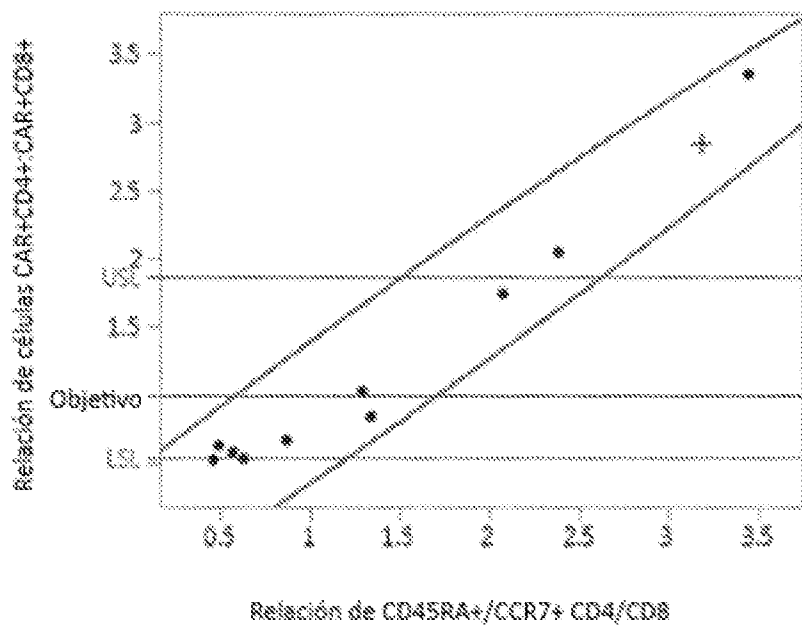


FIG. 2A

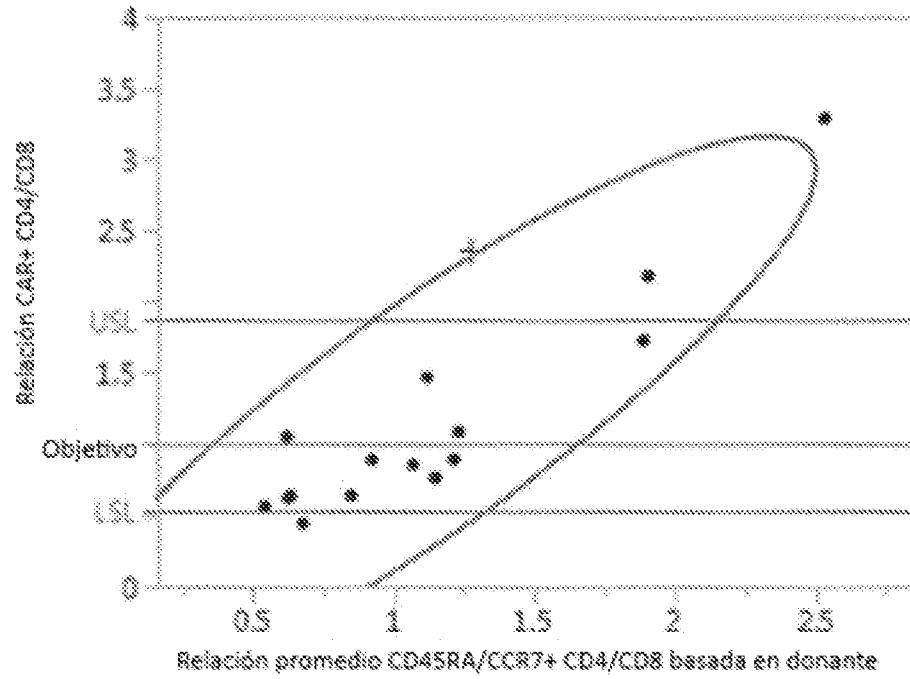


FIG. 2B

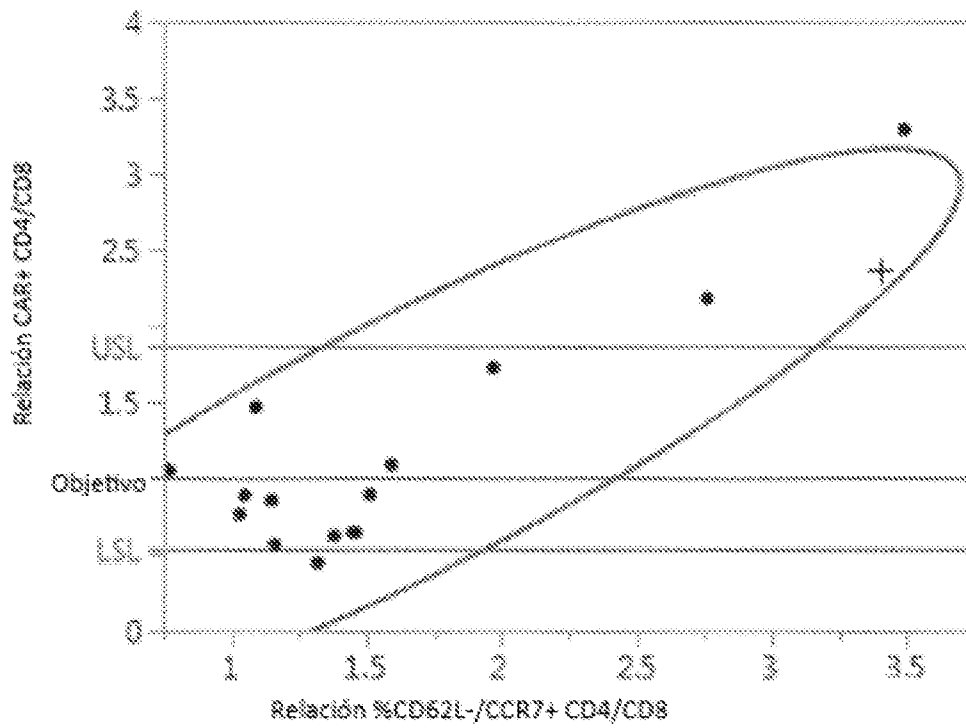


FIG. 2C

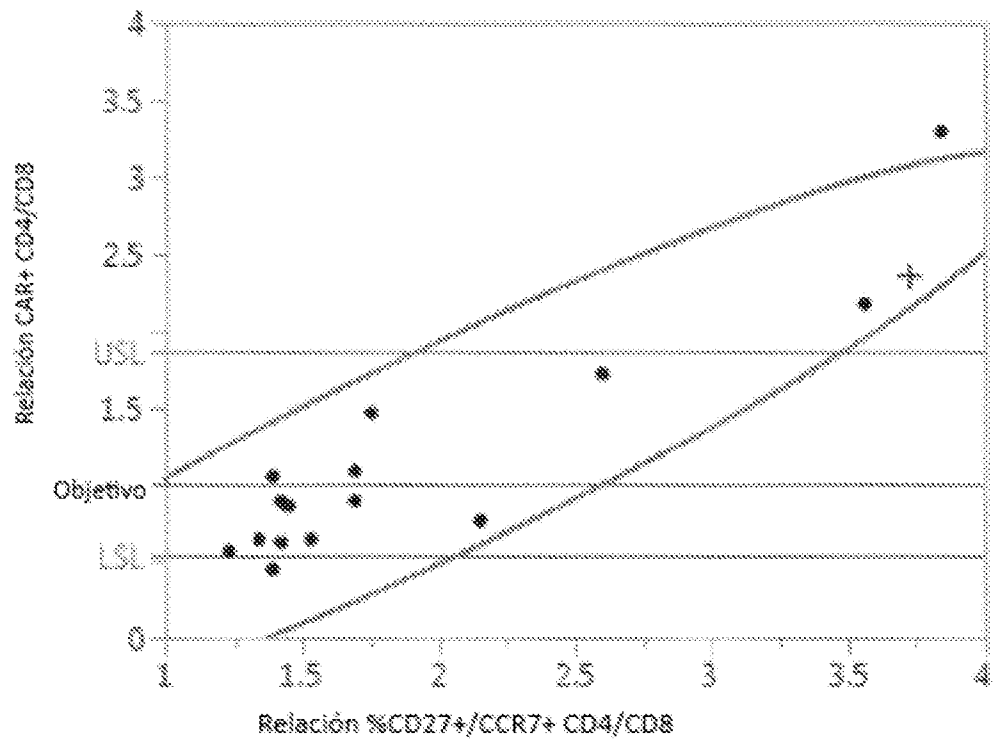


FIG. 3A

Ajuste bivariado de relación CAR+ CD4/CD8 por relación entrante %CD27+CCR7+ CD4/CD8

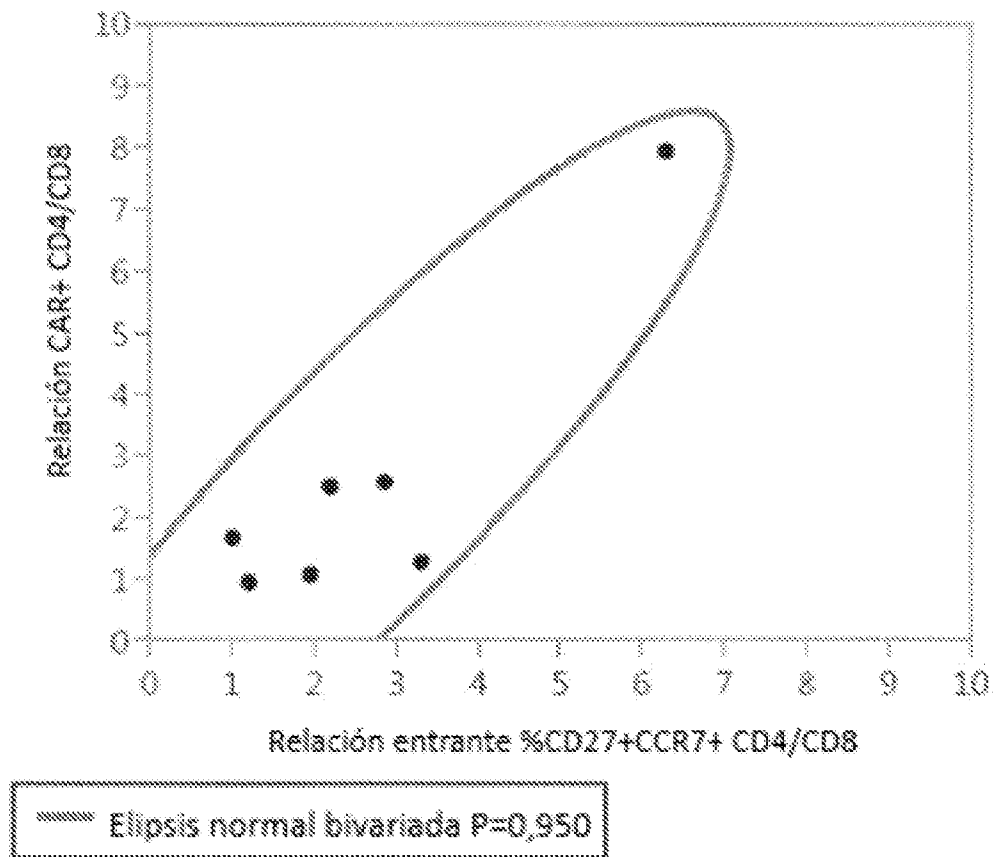
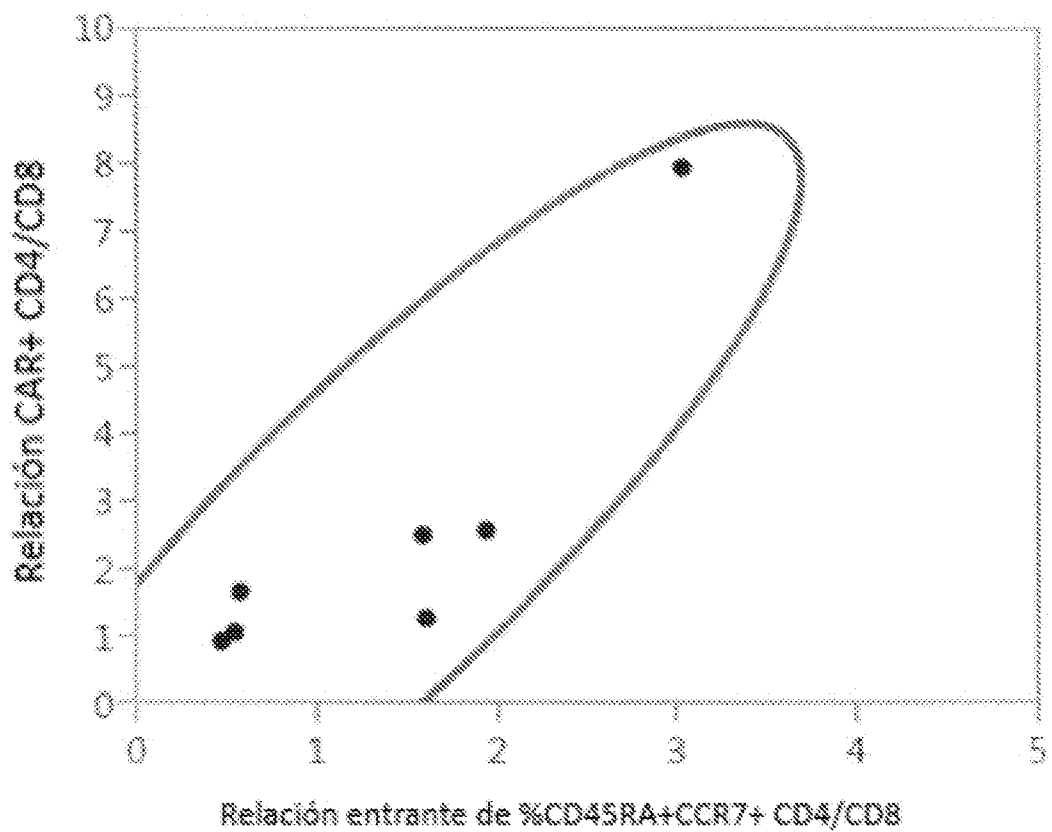


FIG. 3B

Ajuste bivariado de relación CAR+ CD4/CD8 por relación entrante %CD45RA+CCR7+ CD4/CD8



Elipsis normal bivariada P=0,950

FIG. 3C

Ajuste bivariado de relación CAR+ CD4/CD8 por relación entrante %CD62L-CCR7+ CD4/CD8

