

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 009 018**

51 Int. Cl.:

A61K 35/17 (2015.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.07.2018** **PCT/US2018/044263**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2019** **WO19027850**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2018** **E 18759009 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2025** **EP 3661528**

54 Título: **Reactivos para la expansión de células que expresan receptores recombinantes**

30 Prioridad:

29.07.2017 US 201762538671 P

08.12.2017 US 201762596742 P

09.02.2018 US 201862628889 P

01.05.2018 US 201862665468 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.03.2025

73 Titular/es:

JUNO THERAPEUTICS, INC. (100.00%)

400 Dexter Avenue North, Suite 1200

Seattle, WA 98109, US

72 Inventor/es:

HAUSKINS, COLLIN;

HUSSELL, SCOTT;

SIERRA, CATHERINE y

WORKS, MELISSA

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

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

ES 3 009 018 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

Reactivos para la expansión de células que expresan receptores recombinantes

5 **Campo**

La presente divulgación proporciona composiciones y métodos para estimular, enriquecer, expandir y/o activar células genomanipuladas que expresan un receptor recombinante, por ejemplo, un receptor de antígeno quimérico. En algunas realizaciones, los métodos proporcionados incluyen la estimulación *ex vivo* o *in vitro*, el enriquecimiento, la expansión y/o la activación de células mediante incubación con una partícula, por ejemplo, una partícula de perla, con una molécula de unión unida que reconoce o se une al receptor recombinante. En algunas realizaciones, la molécula de unión unida es un polipéptido, por ejemplo, un antígeno polipéptido o un anticuerpo antiidiotipo que se une al receptor recombinante. En algunas realizaciones, las composiciones proporcionadas se pueden usar en métodos para preparar células, por ejemplo, linfocitos T genomanipulados, para la inmunoterapia adoptiva.

15 **Antecedentes**

Existen diversas estrategias disponibles para estimular o expandir poblaciones celulares *in vitro* o *ex vivo*, incluyendo para expandir linfocitos T específicos de antígeno *in vitro* para su uso en inmunoterapia celular adoptiva o terapia antineoplásica. Se necesitan estrategias mejoradas para estimular o expandir poblaciones celulares, incluyendo para fines de investigación, de diagnóstico y terapéuticos. Se proporcionan reactivos, métodos y artículos de fabricación y kits que satisfacen dichas necesidades.

El documento WO2016166544A1 describe células gamma delta modificadas y usos de las mismas. El documento WO2017059796A1 describe la activación y la expansión de linfocitos T. El documento WO2018023100A2 describe anticuerpos antiidiotipos y métodos relacionados. Pelletier Marc *et al.*, Journal of Biological Chemistry, American Society for Biochemistry and Molecular Biology, EE. UU., (20030829), vol. 278, n.º 35, doi:10.1074/JBC.M305754200, ISSN 0021-9258, páginas 33127-33133 describe la comparación de las proteínas de fusión de IgG solubles señuelo de BAFF-R y BCMA como antagonistas de BAFF. Lina Cui *et al.*, Bioconjugate Chemistry (20110420), vol. 22, n.º 4, doi:10.1021/bc100579d, ISSN 1043-1802, páginas 546-550, describen la formación de complejos supramoleculares de siglec CD22 de membrana mediada por un ligando heterobifuncional polivalente que actúa como molde sobre IgM.

30 **Sumario**

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

La invención proporciona un método *in vitro* o *ex vivo* para expandir células, que comprende incubar una composición de entrada, comprendiendo dicha composición de entrada células que expresan un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular que se une específicamente o reconoce un antígeno, con una pluralidad de partículas que son o comprenden perlas, en donde la pluralidad de partículas comprende un diámetro medio de entre o entre aproximadamente 2 µm y 5 µm y tienen unida una molécula de unión que se une específicamente a o reconoce el dominio de unión a antígeno, en donde:

el antígeno es CD19;

la molécula de unión es un anticuerpo antiidiotipo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente al dominio de unión a antígeno; y

la unión de la molécula de unión al dominio de unión a antígeno induce la expansión de las células que comprenden el receptor de antígeno quimérico, produciendo de este modo una composición de salida que comprende células expandidas.

En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno contiene un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos casos, el fragmento de unión a antígeno es o contiene un fragmento de anticuerpo monocatenario. En algunas realizaciones, el fragmento de unión al antígeno del mismo contiene regiones variables de anticuerpo unidas por un enlazador flexible. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, el fragmento de unión a antígeno del mismo es o contiene un scFv.

En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la molécula de unión no se une ni reconoce una región enlazadora o espaciadora del receptor de antígeno recombinante, conectando dicha región enlazadora o espaciadora el dominio de unión a antígeno con el dominio transmembrana del receptor de antígeno. La molécula de unión es un anticuerpo antiidiotipo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente al dominio de unión a antígeno.

En el presente documento se divulga un método para expandir células, que comprende incubar una composición de entrada, comprendiendo dicha composición de entrada células que expresan un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular que se une específicamente o reconoce un antígeno, con una pluralidad de partículas que son o comprenden perlas que tienen unida una molécula de unión que se une específicamente a o reconoce el dominio de unión a antígeno, en donde (i) la pluralidad de partículas son de una

composición que tiene una concentración de la molécula de unión de entre 0,5 µg/ml y 500 µg/ml, inclusive, y, durante la incubación, la relación de células totales presentes en la composición de entrada con respecto a la pluralidad de partículas es de 0 a 1:5, inclusive; y (ii) la unión de la molécula de unión al dominio de unión a antígeno induce la expansión de las células que comprenden el receptor de antígeno quimérico, produciendo de este modo una composición de salida que comprende células expandidas.

En algunas de cualquiera de estas realizaciones, el dominio de unión a antígeno del receptor de antígeno es o contiene el anticuerpo SJ25C1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, el dominio de unión a antígeno del receptor de antígeno es o contiene el anticuerpo FMC63 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En algunas de cualquiera de estas realizaciones, el fragmento de unión a antígeno es o contiene un scFv. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, el antígeno es humano. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo contiene al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina. En algunos ejemplos, la al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina contiene una región Fc o una porción del Fc que contiene los dominios CH2 y CH3. En algunas realizaciones, la región constante o región Fc procede de IgG humana.

En algunas de cualquiera de estas realizaciones, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo inalterado o un anticuerpo de longitud completa. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la molécula de unión está unida covalentemente o no covalentemente a las partículas, por ejemplo, perlas. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la molécula de unión está unida a cada una de la pluralidad de partículas, por ejemplo, perlas, en o cerca del residuo de aminoácidos en el extremo C de la molécula de unión y/o la unión de la molécula de unión a cada una de la pluralidad de partículas, por ejemplo, perlas, se realiza de tal manera que la región o epítipo de la molécula de unión reconocida por el dominio de unión a antígeno del receptor de antígeno está orientada de manera que sea capaz de ser reconocida por el receptor de antígeno.

En algunas de cualquiera de estas realizaciones, las partículas que son o comprenden perlas, son partículas sintéticas, partículas insolubles, partículas sólidas o son partículas no celulares. Las partículas son o comprenden perlas. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la pluralidad de partículas contiene perlas. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, las partículas son o comprenden uno o más polímeros u oligómeros y/o son poliméricas y/u oligoméricas. La pluralidad de partículas comprende un diámetro medio de entre 0,5 µm y 5 µm. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la pluralidad de partículas, que son o comprenden perlas, incluye un diámetro medio de aproximadamente 2,8 µm. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la pluralidad de partículas, que son o comprenden perlas, incluye un diámetro medio de aproximadamente 4,5 µm. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la pluralidad de partículas, que son o comprenden perlas, incluye una densidad media de entre aproximadamente 0,5 g/cm³ y 5,0 g/cm³ o entre 0,5 g/cm³ y 1 g/cm³ o entre 1 g/cm³ y 2 g/cm³. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la pluralidad de partículas, que son o comprenden perlas, incluye una densidad media de aproximadamente 1,3 g/cm³. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la pluralidad de partículas, que son o comprenden perlas, incluye una densidad media de aproximadamente 1,5 g/cm³.

En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la pluralidad de partículas, que son o comprenden perlas, es monodispersa. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la molécula de unión está unida covalentemente a las partículas. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la partícula contiene un grupo funcional expuesto en la superficie para la unión de la molécula de unión y/o en donde la molécula de unión está unida covalentemente a la partícula a través de un grupo funcional expuesto en la superficie.

En algunas de cualquiera de estas realizaciones, el grupo funcional expuesto en la superficie es un grupo amino, un grupo carboxilo, un grupo tiol, un grupo aldehído, un grupo clorometilo, un grupo epoxi, un grupo hidroxilo, un grupo tosilo o un grupo hidrazina. En algunas realizaciones, el grupo funcional expuesto en la superficie es un grupo tosilo.

En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la pluralidad de partículas, que son o comprenden perlas, son biocompatibles o no tóxicas para las células. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la pluralidad de partículas, que son o comprenden perlas, contiene partículas que incluyen vidrio, sílice, poliésteres de ácidos hidroxicarboxílicos, polianhídridos de ácidos dicarboxílicos, copolímeros de ácidos hidroxicarboxílicos, copolímeros de ácidos dicarboxílicos o metal. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, las partículas, que son o comprenden perlas, contienen una superficie que incluye un polímero, un polisacárido, una sílice, un ácido graso, un carbono o una combinación de los mismos. En algunos ejemplos, el polímero es polietilenglicol, poli(ácido láctico-co-glicólico), poliglutaraldehído, poliuretano, poliestireno y alcohol polivinílico o combinaciones de los mismos. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la pluralidad de partículas contiene partículas que incluyen una superficie hidrófoba. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la pluralidad de partículas, que son o comprenden perlas, contiene partículas que incluyen una superficie de poliestireno.

En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la pluralidad de partículas, que son o comprenden perlas, contiene partículas que son magnéticas y/o incluye un núcleo magnético, un núcleo paramagnético o un núcleo superparamagnético.

- En algunas de cualquiera de estas realizaciones, las partículas son de una composición que tiene una concentración de la molécula de unión de entre o entre aproximadamente 0,5 µg/ml y 500 µg/ml, 1 µg/ml y 200 µg/ml o 5 µg/ml y 100 µg/ml, inclusive. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, las partículas son de una composición que tiene una concentración de la molécula de unión de al menos o al menos aproximadamente 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml o 200 µg/ml. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, cada una de la pluralidad de partículas, por ejemplo, perlas, contiene al menos o aproximadamente al menos 10 copias, 10² copias, 10³ copias, 10⁴ copias, 10⁵ copias o 10⁶ copias de la molécula de unión.
- En algunas de cualquiera de estas realizaciones, al menos una porción de la incubación se realiza en presencia de un agente que se une específicamente a una molécula adicional en la célula para proporcionar una señal accesoria y/o para bloquear una señal inhibidora. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, el agente se proporciona junto con las partículas, que son o comprenden perlas, opcionalmente el agente está contenido en cada una de la pluralidad de partículas o un subconjunto de las mismas. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, el agente se proporciona por separado de la pluralidad de partículas, que son o comprenden perlas.
- En algunas de cualquiera de estas realizaciones, las partículas, que son o comprenden perlas, incluyen además un agente que se une específicamente a una molécula adicional en la célula para proporcionar una señal accesoria y/o para bloquear una señal inhibidora. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, el agente es un ligando o es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la molécula es una molécula coestimuladora o es un correceptor de activación. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la molécula coestimuladora o correceptor activador es OX-40, ICOS, DAP10, CD28 o 4-1BB. En algunas realizaciones, la molécula es un ligando de un receptor o correceptor activador, tal como OX-40L, ICOSL, B7-1, B7-2 o 4-1BBL. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la molécula es un receptor inhibidor. En algunos ejemplos, el receptor inhibidor es CTLA-4, PD-1, LAG-3, Tim-3, BTLA o TIGIT. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, el agente está unido covalentemente a las partículas, por ejemplo, perlas. En algunas realizaciones, la molécula es un ligando es un receptor inhibidor, tal como PD-L1, PD-L2, CD155, CD112 o LIGHT.
- En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la relación, opcionalmente la relación molar o en peso, de la molécula de unión y el agente contenido por las partículas, que son o comprenden perlas, es o es aproximadamente 1:1. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la relación de células totales presentes en la composición de entrada con respecto a las partículas, que son o comprenden perlas, es de o es aproximadamente 5:1 a 1:5, de 3:1 a 1:3 o de 2:1 a 1:2. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la relación de células totales presentes en la composición de entrada con respecto a las partículas, que son o comprenden perlas, es de o de aproximadamente 1:0,1 a 1:5. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la relación de células totales presentes en la composición de entrada con respecto a las partículas, que son o comprenden perlas, es o es aproximadamente 1:1.
- En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la incubación se realiza durante al menos o más o más de aproximadamente 2 horas, 4 horas, 8 horas, 12 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días o 14 días. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la incubación se realiza a una temperatura entre o entre aproximadamente 30 °C y 39 °C, inclusive. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la incubación se realiza a una temperatura de 37 °C ± 2,0 °C.
- En algunas de cualquiera de estas realizaciones, las células incluyen células inmunitarias o células madre pluripotentes inducidas (iPSC). En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la célula inmunitaria es un linfocito T o un linfocito NK. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, las células contienen linfocitos T CD4+ y/o CD8+. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la relación de las células CD4+ con respecto a las células CD8+ es o es aproximadamente 1:1, 1:2, 2:1, 1:3 o 3:1. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, las células son células primarias obtenidas de un sujeto, opcionalmente un sujeto humano. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, las células son humanas.
- En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la composición de entrada se produce mediante un método que incluye poner en contacto una composición de células con una molécula de ácido nucleico que codifica el receptor de antígeno recombinante en condiciones para introducir la molécula de ácido nucleico en una o más células en la composición.
- También se proporciona en el presente documento un método para genomanipular una célula, incluyendo poner en contacto una composición de células con una molécula de ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno recombinante en condiciones para introducir la molécula de ácido nucleico en una o más células en la composición, produciendo así una composición de entrada; e incubar células de la composición de entrada de acuerdo con los métodos reivindicados. En algunas realizaciones, al menos una porción de la puesta en contacto y la incubación se realizan simultáneamente.
- En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la molécula de ácido nucleico se incluye en un vector vírico, un vector episomal o un transposón. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la puesta en contacto se realiza mediante transferencia génica de transposón/transposasa. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la puesta en

contacto se realiza mediante transducción con un vector vírico. En algunas realizaciones, el vector vírico es un retrovirus, que opcionalmente es un vector gamma-retrovírico o un vector lentivírico.

En algunos casos, la puesta en contacto incluye una etapa de espinoculación del vector vírico con la composición de células. En algunos casos, la espinoculación incluye rotar, en una cavidad interna de una cámara centrífuga, las partículas de vector vírico y la composición de células, en donde la rotación se produce a una fuerza centrífuga relativa en una superficie interna de la pared lateral de la cavidad que es de entre o entre aproximadamente 500 g y 2500 g, 500 g y 2000 g, 500 g y 1600 g, 500 g y 1000 g, 600 g y 1600 g, 600 g y 1000 g, 1000 g y 2000 g o 1000 g y 1600 g, cada uno inclusive; o al menos o al menos aproximadamente 600 g, 800 g, 1000 g, 1200 g, 1600 g o 2000 g. En algunas realizaciones, la espinoculación se realiza durante un tiempo que es superior a o aproximadamente 5 minutos, superior a o aproximadamente 10 minutos, superior a o aproximadamente 15 minutos, superior a o aproximadamente 20 minutos, superior a o aproximadamente 30 minutos, superior a o aproximadamente 45 minutos, superior a o aproximadamente 60 minutos, superior a o aproximadamente 90 minutos o superior a o aproximadamente 120 minutos; o entre o entre aproximadamente 5 minutos y 60 minutos, 10 minutos y 60 minutos, 15 minutos y 60 minutos, 15 minutos y 45 minutos, 30 minutos y 60 minutos o 45 minutos y 60 minutos, cada uno inclusive.

En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la puesta en contacto se realiza en presencia de un adyuvante de la transducción. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la composición de células contiene una pluralidad de linfocitos T y, antes de la puesta en contacto, el método no incluye la estimulación o activación de los linfocitos T.

En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la composición de células contiene una pluralidad de linfocitos T y, antes de la puesta en contacto, el método no incluye la incubación de la composición en presencia de un agente o agentes capaces de inducir una señal a través de un complejo TCR y/o la incubación en presencia de un agente o agentes capaces de inducir la proliferación de linfocitos T, linfocitos T CD4+ y/o linfocitos T CD8+; y/o moléculas de unión a CD3, moléculas de unión a CD28, IL-2 recombinante, IL-15 recombinante e IL-7 recombinante o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, antes de la puesta en contacto, el método no incluye la estimulación de los linfocitos T en presencia de un anticuerpo anti CD3 y/o un anticuerpo anti CD28.

En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la composición de células contiene una pluralidad de linfocitos T, habiéndose obtenido dicha pluralidad de células a partir de una muestra de un sujeto, en donde la puesta en contacto se inicia no más de 24 horas después de obtener la muestra del sujeto; y/o antes de la puesta en contacto, los linfocitos T no han sido sometidos a una temperatura superior o superior a aproximadamente 15 °C, aproximadamente 18 °C, aproximadamente 22 °C o aproximadamente 25 °C durante una duración de más de 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas o 24 horas después de obtener la muestra del sujeto; y/o antes de la puesta en contacto, los linfocitos T no han sido sometidos a una temperatura de, de aproximadamente, superior o superior a aproximadamente 37 °C $\pm$ 2,0 °C durante una duración de más de 15 minutos, 30 minutos, 1 hora o 2 horas después de obtener la muestra del sujeto. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, antes de dicha puesta en contacto, no más del 5 %, 10 %, 20 %, 30 % o el 40 % de los linfocitos T son células activadas, expresan un marcador de superficie seleccionado del grupo que consiste en HLA-DR, CD25, CD69, CD71, CD40L y 4-1BB; incluyen la expresión intracelular de una citocina seleccionada del grupo que consiste en IL-2, IFN-gamma, TNF-alfa, se encuentran en la fase G1 o posterior del ciclo celular y/o son capaces de proliferar.

En algunas de cualquiera de estas realizaciones, el método incluye además, antes de la incubación o la puesta en contacto, obtener una muestra biológica del sujeto que contiene las células y, opcionalmente, seleccionar o enriquecer las células, opcionalmente los linfocitos T, de la muestra. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, el porcentaje de células que expresan el receptor de antígeno recombinante en la composición de entrada es inferior o igual a aproximadamente el 75 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 15 %, 10 % o menos. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la composición de células o la composición de entrada contiene al menos o al menos aproximadamente 1×10^2 células, 1×10^3 células, 1×10^4 células, 1×10^5 células, 1×10^6 células o 1×10^7 células.

En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la expresión superficial de un marcador de activación o marcador de agotamiento de células presente en la composición de salida es menor que la expresión superficial del marcador en una composición de células producida después de una incubación similar pero en presencia de una molécula estimuladora policlonal capaz de activar uno o más dominios de señalización intracelular de uno o más componentes de un complejo TCR. En algunos casos, el marcador de agotamiento es un receptor inhibitor. En algunos casos, el marcador de agotamiento es PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, BTLA o TIGIT. En algunos ejemplos, el marcador de activación es HLA-DR, CD25, CD69, CD71, CD40L o 4-1BB. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la expresión superficial es de al menos o al menos aproximadamente 1,2 veces, 1,5 veces, 2,0 veces, 3,0 veces, 4,0 veces, 5,0 veces, 10,0 veces o más.

En algunas de cualquiera de estas realizaciones, el número de células en la composición de salida es sustancialmente el mismo o es mayor que el número de células en una composición de células producida por una incubación similar pero en presencia de una molécula estimuladora policlonal capaz de activar uno o más dominios de señalización intracelular de uno o más componentes de un complejo TCR. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la molécula estimuladora policlonal contiene un anticuerpo anti CD3 o fragmento y/o un anticuerpo anti CD28 o fragmento.

En algunas de cualquiera de estas realizaciones, el número de células en la composición de salida es mayor que el número de células en la composición de entrada en más de o más de aproximadamente 1,2 veces, 1,5 veces, 2,0 veces, 3,0 veces, 4,0 veces, 5,0 veces, 10,0 veces, 25 veces, 50 veces, 100 veces o más. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, el porcentaje de células que contiene el receptor de antígeno recombinante en la composición de salida es superior o superior a aproximadamente el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, el número de células en la composición de salida que contiene el receptor de antígeno recombinante se aumenta o se enriquece en 1,2 veces, 2,0 veces, 3,0 veces, 4,0 veces, 5,0 veces, 6,0 veces, 7,0 veces, 8,0 veces, 9,0 veces, 10 veces o más en comparación con el número de células que contiene el receptor de antígeno en la composición de entrada.

En algunas de cualquiera de estas realizaciones, al menos una porción de la incubación se realiza en presencia de uno o más agentes adicionales que modulan la expansión o actividad celular. En algunos casos, el uno o más agentes adicionales es lenalidomida.

En algunas de cualquiera de estas realizaciones, el método se realiza *in vitro* o *ex vivo*. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, el CAR comprende además un dominio de señalización intracelular que contiene un ITAM. En algunos casos, el dominio de señalización intracelular contiene un dominio intracelular de una cadena CD3-zeta (CD3ζ). En algunas realizaciones, el CAR contiene además una región de señalización coestimuladora. En algunos aspectos, la región de señalización coestimuladora contiene un dominio de señalización de CD28 o 4-1BB. En algunos ejemplos, el dominio coestimulador es CD28. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, el método incluye además la eliminación de la pluralidad de partículas, por ejemplo, perlas, de la composición de salida.

En el presente documento se proporciona una composición de células producidas mediante cualquiera de los métodos reivindicados

Breve descripción de los dibujos

La **figura 1** muestra un histograma de la tinción con Cell Trace Violet (CTV) en linfocitos T CD3⁺ que expresan CAR anti BCMA (linfocitos T con CAR) y células CD3⁺ que no expresan un CAR (simulado) tras la incubación con perlas conjugadas con BCMA.

La **figura 2A** muestra gráficos de puntos para la expresión superficial de CD25 (eje y) y la intensidad de tinción con CTV (eje x) en células después de la incubación con perlas conjugadas con anticuerpos anti CD3/anti CD28 (izquierda) o perlas conjugadas con BCMA (derecha).

La **figura 2B** muestra un histograma de tinción con CTV de células después del tratamiento con perlas conjugadas con anticuerpos anti CD3/anti CD28 o perlas conjugadas con BCMA.

La **figura 2C** muestra histogramas de expresión de PD-1 en células CD4⁺ (izquierda) o células CD8⁺ (derecha) después de la incubación de células con perlas conjugadas con anticuerpos anti CD3/anti CD28 o perlas conjugadas con BCMA.

La **figura 3A** muestra el porcentaje de linfocitos T con CAR+ anti BCMA después de la incubación de cada una de tres composiciones de linfocitos T diferentes que contienen los linfocitos T que expresan CAR (cada una generada a partir de un donante diferente) con perlas conjugadas con BCMA durante hasta 14 días. Los resultados de cada composición celular se representan gráficamente por separado con triángulos, cuadrados y círculos.

La **figura 3B** muestra la expresión superficial según lo determinado por la intensidad de fluorescencia media (MFI) para la detección de CD25 (izquierda), CCR7 (centro) y CD27 (derecha) en células CD8⁺ después de cuatro, siete o catorce días de incubación con perlas conjugadas con BCMA durante hasta 14 días. Los resultados se muestran para cada una de las tres composiciones celulares diferentes que contienen células que expresan CAR anti BCMA descritas en la **figura 3A** y se representan gráficamente por separado con triángulos, cuadrados y círculos.

La **figura 4A** muestra gráficos para la expresión superficial de CD25 en linfocitos T CD4⁺ (paneles de la izquierda) o linfocitos T CD8⁺ (paneles de la derecha) presentes en una composición de linfocitos T con CAR+ anti BCMA después de la incubación con diferentes cantidades de perlas conjugadas con BCMA. La **figura 4B** muestra gráficos de histograma para la expresión superficial de PD-1 en linfocitos T CD4⁺ (paneles de la izquierda) o linfocitos T CD8⁺ (paneles de la derecha) presentes en una composición de linfocitos T con CAR+ anti BCMA después de la incubación con diferentes cantidades de perlas conjugadas con BCMA. BCMA 50, BCMA 25, BCMA 10 y BCMA 5 indican perlas conjugadas con BCMA generadas incubando BCMA con las perlas en una cantidad de 50, 25, 10 y 5 µg de BCMA por aproximadamente 4 x 10⁸ perlas, respectivamente.

Las **figuras 5A-B** muestran gráficos que muestran el número total de linfocitos T CD3⁺ (**figura 5A**) o los niveles del colorante marcador de proliferación CTV en los linfocitos T CD4⁺ (**figura 5B**) presentes en una composición de linfocitos T con CAR+ anti BCMA después de la incubación con diferentes cantidades de perlas conjugadas con BCMA. BCMA 50, BCMA 25, BCMA 10 y BCMA 5 indican perlas conjugadas con BCMA generadas incubando BCMA con las perlas en una cantidad de 50, 25, 10 y 5 µg de BCMA por aproximadamente 4 x 10⁸ perlas, respectivamente.

La **figura 6** muestra un gráfico que muestra la expresión superficial de CD25 en los linfocitos T CD4⁺ presentes en una composición de linfocitos T con CAR+ anti BCMA después de la incubación con diferentes cantidades de perlas conjugadas con BCMA. BCMA 50, BCMA 25, BCMA 10 y BCMA 5 indican perlas conjugadas con BCMA generadas incubando BCMA con las perlas en una cantidad de 50, 25, 10 y 5 µg de BCMA por aproximadamente

4 x 10⁸ perlas, respectivamente.

Las **figuras 7A-7H** muestran la tinción de diversos marcadores o el nivel de proliferación en composiciones de linfocitos T con CAR+ anti BCMA incubadas con perlas conjugadas con BCMA. La **figura 7A** muestra histogramas de citometría de flujo para la expresión superficial de CD25 en linfocitos T CD4+ (paneles de la izquierda) o linfocitos T CD8+ (paneles de la derecha) presentes en una composición de linfocitos T con CAR+ anti BCMA después de la incubación con diferentes cantidades de perlas conjugadas con BCMA. La **figura 7B** muestra histogramas de citometría de flujo para la expresión superficial de CD25 en linfocitos T CD4+ (paneles de la izquierda) o linfocitos T CD8+ (paneles de la derecha) presentes en una composición de linfocitos T con CAR+ anti BCMA después de la incubación con diferentes relaciones de linfocitos T con respecto a perlas (composición de perlas conjugadas con BCMA de 200 µg/ml) o anti CD3 inmovilizado. La **figura 7C** muestra histogramas de citometría de flujo para la expresión superficial de CD69 en linfocitos T CD4+ (paneles de la izquierda) o linfocitos T CD8+ (paneles de la derecha) presentes en una composición de linfocitos T con CAR+ anti BCMA después de la incubación con diferentes relaciones de linfocitos T con respecto a perlas (composición de perlas conjugadas con BCMA de 200 µg/ml) o anti CD3 inmovilizado. La **figura 7D** muestra histogramas de citometría de flujo para la expresión superficial de TIM3 en linfocitos T CD4+ (paneles de la izquierda) o linfocitos T CD8+ (paneles de la derecha) presentes en una composición de linfocitos T con CAR+ anti BCMA después de la incubación con diferentes relaciones de linfocitos T con respecto a perlas (composición de perlas conjugadas con BCMA de 200 µg/ml) o anti CD3 inmovilizado. La **figura 7E** muestra histogramas de citometría de flujo para la expresión superficial de PD-1 en linfocitos T CD4+ (paneles de la izquierda) o linfocitos T CD8+ (paneles de la derecha) presentes en una composición de linfocitos T con CAR+ anti BCMA después de la incubación con diferentes relaciones de linfocitos T con respecto a perlas (composición de perlas conjugadas con BCMA de 200 µg/ml) o anti CD3 inmovilizado. La **figura 7F** muestra un gráfico de histograma de tinción con CTV (medida de proliferación) de células totales en una composición de linfocitos T con CAR+ anti BCMA después de la incubación con perlas (composición de perlas conjugadas con BCMA de 200 µg/ml) en una relación de linfocitos T con respecto a perlas de 1:1 y en presencia o ausencia de lenalidomida 5 µM. La **figura 7G** y la **figura 7H** muestran histogramas de citometría de flujo para CD25 en linfocitos T CD4+ (paneles de la izquierda) o linfocitos T CD8+ (paneles de la derecha) presentes en una composición de linfocitos T con CAR+ anti BCMA después de la incubación con perlas (composición de perlas conjugadas con BCMA de 200 µg/ml) en una relación de linfocitos T con respecto a perlas de 1:1 o anti CD3 inmovilizado, respectivamente, en presencia o ausencia de lenalidomida. En las figuras anteriores, "50", "100", y "200" y indican perlas conjugadas con BCMA generadas incubando BCMA con las perlas en una cantidad de 50, 100 y 200 µg de BCMA por aproximadamente 4 x 10⁸ perlas, respectivamente.

Las **figuras 8A-8I** muestran gráficos que muestran los niveles de factores de transcripción y marcadores de activación en o sobre los linfocitos T CD4+ (paneles de la izquierda) o linfocitos T CD8+ (paneles de la derecha) presentes en una composición de linfocitos T con CAR+ anti BCMA después de la incubación sin estimulación o con diferentes cantidades de perlas conjugadas con BCMA o perlas conjugadas con anti CD3 y anti CD28 y en presencia de 0 µM, 0,5 µM o 50 µM de lenalidomida. Se muestran los niveles de Blimp1 (**figura 8A**), CD25 (**figura 8B**), CD31 (**figura 8C**), PD-1 (**figura 8D**), Tbet (**figura 8E**), EOMES (**figura 8F**), GATA3 (**figura 8G**), Helios (**figura 8H**) e Ikaros (**figura 8I**). 200 BCMA, 50 BCMA y 5 BCMA indican perlas conjugadas con BCMA generadas mediante la incubación de BCMA con las perlas en una cantidad de 200, 50 y 5 µg de BCMA por aproximadamente 4 x 10⁸ perlas, respectivamente.

Las **figuras 9A-9C** muestran gráficos que muestran los niveles de IFN-gamma extracelular (**figura 9A**), IL-2 (**figura 9B**) y TNF alfa (**figura 9C**) de cultivos después de la incubación de una composición de linfocitos T con CAR+ anti BCMA con dos cantidades diferentes de perlas conjugadas con BCMA en presencia o ausencia de lenalidomida 5 µM. 50 µg de BCMA y 5 µg de BCMA indican perlas conjugadas con BCMA generadas mediante la incubación de BCMA con las perlas en una cantidad de 50 y 5 µg de BCMA por aproximadamente 4 x 10⁸ perlas, respectivamente.

La **figura 9D** muestra un gráfico que muestra los niveles de IL-2 extracelular de cultivos después de la incubación de una composición de linfocitos T con CAR+ anti BCMA de células de dos donantes diferentes (donante A y donante B) con diferentes cantidades de perlas conjugadas con BCMA en presencia de 0 µM, 1 µM o 5 µM de lenalidomida. 200 BCMA y 5 BCMA indican perlas conjugadas con BCMA generadas mediante la incubación de BCMA con las perlas en una cantidad de 200 y 5 µg de BCMA por aproximadamente 4 x 10⁸ perlas, respectivamente.

La **figura 9E** muestra el análisis citométrico de flujo de STAT5 fosforilado (pSTAT5) después de 2 horas de estimulación de CAR (estim.) con 50 µg de perlas de BCMA. Se muestra un control sin estimulación con una línea discontinua. La **figura 9F** muestra el análisis citométrico de flujo de los niveles intracelulares de citocinas en un donante de linfocitos T con CAR normal representativo después de 24 horas de estimulación con perlas de BCMA (seleccionada en CD3+ vivas transducidas).

La **figura 9G** y la **figura 9H** muestran el recuento celular total después del cultivo de una composición de linfocitos T con CAR+ anti BCMA después de la incubación durante 4 días (**figura 9G**) o 7 días (**figura 9H**) con diferentes cantidades de perlas conjugadas con BCMA en presencia de lenalidomida 5 µM. 50 BCMA y 5 BCMA indican perlas conjugadas con BCMA generadas mediante la incubación de BCMA con las perlas en una cantidad de 50 y 5 µg de BCMA por aproximadamente 4 x 10⁸ perlas, respectivamente.

La **figura 9I** muestra gráficos de histograma de tinción con CTV (medida de proliferación) de linfocitos T CD4+ o linfocitos T CD8+ en una composición de linfocitos T con CAR+ anti BCMA después de la incubación durante 4 o 7 días con perlas conjugadas con BCMA en presencia de lenalidomida 5 µM (Len 5 µM) o ausencia de lenalidomida (vehículo).

Las **figuras 9J y 9K** muestran gráficos que muestran el porcentaje de células positivas para el marcador sustituto EGFRt, según lo determinado con un anticuerpo anti EGFR después de la incubación de una composición de linfocitos T con CAR+ anti BCMA durante 4 días (**figura 9J**) o 7 días (**figura 9K**) con diferentes cantidades de perlas conjugadas con BCMA en presencia de lenalidomida 5 μ M o ausencia de lenalidomida (vehículo). "50" y "5" indican perlas conjugadas con BCMA generadas mediante la incubación de BCMA con las perlas en una cantidad de 50 y 5 μ g de BCMA por aproximadamente 4×10^8 perlas, respectivamente.

La **figura 9L** muestra el porcentaje de destrucción celular de células diana RPMI-8226 por células efectoras de linfocitos T con CAR+ anti BCMA que se habían incubado con diferentes cantidades de perlas conjugadas con BCMA en presencia de lenalidomida 5 μ M o ausencia de lenalidomida (vehículo). Se muestra la actividad citolítica de composiciones que contienen una relación de células efectoras con respecto a células diana de 3:1 o 1:1 y en presencia o ausencia adicional de lenalidomida. "50" y "5" indican perlas conjugadas con BCMA generadas mediante la incubación de BCMA con las perlas en una cantidad de 50 y 5 μ g de BCMA por aproximadamente 4×10^8 perlas, respectivamente.

La **figura 9M** muestra un gráfico que muestra los niveles de IFN-gamma extracelular producido durante un ensayo de destrucción en un cultivo que contiene células diana RPMI-8226 y células efectoras de linfocitos T con CAR+ anti BCMA frescos o células efectoras de linfocitos T con CAR+ anti BCMA que se habían incubado durante 24 horas o durante siete días con perlas conjugadas con BCMA (composición de 50 μ g/ml generada mediante la incubación de BCMA con las perlas en una cantidad de 50 μ g de BCMA por aproximadamente 4×10^8 perlas). Se muestran los resultados de cultivos que contienen una relación de células efectoras con respecto a células diana de 0,3:1 o 1:1.

La **figura 9N** muestra la destrucción celular normalizada con respecto al recuento de células diana en un cultivo que contiene células diana RPMI-8226 y células efectoras de linfocitos T con CAR+ anti BCMA recientes o células efectoras de linfocitos T con CAR+ anti BCMA que se habían incubado durante 24 horas o durante siete días con perlas conjugadas con BCMA (composición de 50 μ g/ml generada mediante la incubación de BCMA con las perlas en una cantidad de 50 μ g de BCMA por aproximadamente 4×10^8 perlas). Se muestran los resultados de cultivos que contienen una relación de células efectoras con respecto a células diana de 0,3:1 o 1:1.

Las **figuras 10A-10B** muestran los resultados de un ensayo de reestimulación en serie de composiciones de linfocitos T con CAR anti BCMA que se habían incubado durante siete días con perlas conjugadas con BCMA (50 μ g/ml generadas mediante la incubación de BCMA con las perlas en una cantidad de 50 μ g de BCMA por aproximadamente 4×10^8 perlas). Se muestran los resultados de tres composiciones de donantes diferentes. La **figura 10A** y la **figura 10B** muestran la actividad citolítica de los linfocitos T con CAR+ anti BCMA en cada uno de los puntos temporales para dos donantes diferentes.

La **figura 11** muestra un gráfico que muestra el porcentaje de linfocitos T con CAR+ en el tiempo en cinco composiciones de células con CAR+ anti BCMA diferentes que se incubaron en presencia de perlas conjugadas con BCMA (líneas continuas) o con perlas conjugadas con anticuerpos anti CD3/anti CD28 (líneas discontinuas) inmediatamente después de la transducción con un vector lentivírico que codifica el CAR anti BCMA.

La **figura 12A** y la **figura 12B** muestran el factor de expansión y el número de células acumulativo de linfocitos T EGFRt+/CD4+ o linfocitos T EGFRt+/CD4+, respectivamente, estimulados con la relación indicada de perlas recubiertas con anticuerpo antiidiotipo (anti ID B-1) o perlas recubiertas con anticuerpo anti CD3/anti CD28 de control en presencia (líneas continuas) o ausencia (líneas discontinuas) de citocinas. Se muestran los resultados de la estimulación con una relación 3:1 de perlas recubiertas con anticuerpo anti CD3/anti CD28 con respecto a células (círculos), 1:1 de perlas recubiertas con anti ID B-1 con respecto a sobre células (cuadrados) y 1:5 de perlas recubiertas con anti ID B-1 con respecto a células (triángulos).

La **figura 13** muestra los niveles de expresión de PD-1 de linfocitos T CD4+ positivos para un anticuerpo anti EGFR después de la estimulación con la relación indicada de perlas recubiertas con anticuerpo antiidiotipo (anti ID B-1) o perlas recubiertas con anticuerpo anti CD3/anti CD28 de control en presencia (líneas continuas) o ausencia (líneas discontinuas) de citocinas, según se evaluó mediante citometría de flujo los días 3, 7, 10 y 14 de cultivo. Se muestran los resultados de la estimulación con una relación 3:1 de perlas recubiertas con anticuerpo anti CD3/anti CD28 con respecto a células (círculos), 1:1 de perlas recubiertas con anti ID B-1 con respecto a sobre células (cuadrados) y 1:5 de perlas recubiertas con anti ID B-1 con respecto a células (triángulos).

La **figura 14** muestra la viabilidad de los linfocitos T CD4+ o CD8+ que expresan un CAR procedente de FMC63, según se evaluó por citometría de flujo después de la estimulación con la relación indicada de perlas recubiertas con anticuerpo antiidiotipo (anti ID B-1) o perlas recubiertas con anticuerpo anti CD3/anti CD28 de control en presencia (líneas continuas) o ausencia (líneas discontinuas) de citocinas, según se evaluó por citometría de flujo los días 3, 7, 10 y 14 de cultivo. Se muestran los resultados de la estimulación con una relación 1:3 de perlas recubiertas con anticuerpo anti CD3/anti CD28 con respecto a células (círculos), 1:1 de perlas recubiertas con anti ID B-1 con respecto a sobre células (cuadrados) y 1:5 de perlas recubiertas con anti ID B-1 con respecto a células (triángulos).

La **figura 15A** muestra la tinción intracelular de citocinas para IL-2, TNF α e IFN γ de linfocitos T que expresan un CAR procedente de FMC63 después de la estimulación con perlas recubiertas de anticuerpos antiidiotipo específicos de scFv procedente de FMC63 (anti ID B-1). Se muestran los resultados para los linfocitos T CD8+ positivos o negativos para el marcador sustituto EGFRt (EGFRt+ o EGFRt-).

La **figura 15B** muestra la tinción intracelular de citocinas para IL-2, TNF α e IFN γ de linfocitos T que expresan un CAR procedente de FMC63 después de la estimulación con células K562-CD19 que expresan antígeno. Se muestran los resultados de los linfocitos T CD8+ positivos para el marcador sustituto EGFRt.

La **figura 16** muestra el número de duplicaciones de población en un ensayo de estimulación en serie durante un

período de cultivo de 14 días de linfocitos T que expresan un CAR procedente de FMC63 después de la estimulación con la relación indicada de perlas recubiertas con anticuerpo antiidiotipo (anti ID B-1) o perlas recubiertas con anticuerpo anti CD3/anti CD28 de control en presencia (líneas continuas) o ausencia (líneas discontinuas) de citocinas. Se muestran los resultados para los linfocitos T CD4+ positivos para el marcador sustituto EGFRt (EGFRt+) o linfocitos T CD8+ positivos para el marcador sustituto EGFRt (EGFRt+). Se muestran los resultados de la estimulación con una relación 1:3 de perlas recubiertas con anticuerpo anti CD3/anti CD28 con respecto a células (círculos), 1:1 de perlas recubiertas con anti ID B-1 con respecto a sobre células (cuadrados) y 1:5 de perlas recubiertas con anti ID B-1 con respecto a células (triángulos).

Las **figuras 17A-17C** muestran los resultados después de la estimulación de linfocitos T CD4+ o CD8+ que expresan un CAR procedente de FMC63, cultivados solos (líneas continuas) o como cocultivo (líneas discontinuas), con perlas recubiertas de anticuerpos antiidiotipo específicos de scFv procedente de FMC63 (anti ID B-1). Los resultados se muestran para dos donantes diferentes (representados como círculos y cuadrados). La **figura 17A** representa el factor de expansión de linfocitos T CD4+ o linfocitos T CD8+ en los cultivos que fueron positivos para el marcador sustituto EGFRt (EGFRt+/CD4+ o EGFRt+/CD8+). La **figura 17B** muestra la frecuencia de los linfocitos T CD4+ o linfocitos T CD8+ en los cultivos que fueron positivos para el marcador sustituto EGFRt (EGFRt+/CD4+ o EGFRt+/CD8+). La **figura 17C** muestra la viabilidad de los linfocitos T CD4+ o linfocitos T CD8+ en los cultivos.

Las **figuras 18A y 18B** muestran los resultados de citometría de flujo para marcadores de superficie de linfocitos T los días 5, 7 y 9 de cultivo después de la estimulación de linfocitos T CD4+ o CD8+ que expresan un CAR procedente de FMC63, cultivados solos o como cocultivo, con perlas recubiertas de anticuerpos antiidiotipo específicos de scFv procedente de FMC63 (anti ID B-1). La **figura 18A** muestra la expresión superficial de PD-1 en los linfocitos T CD4+ o linfocitos T CD8+ en los cultivos que fueron positivos para el marcador sustituto EGFRt (EGFRt+/CD4+ o EGFRt+/CD8+). La **figura 18B** muestra la expresión superficial de CD25 en linfocitos T CD4+ o linfocitos T CD8+ en los cultivos que fueron positivos para el marcador sustituto EGFRt (EGFRt+/CD4+ o EGFRt+/CD8+).

La **figura 19A** muestra los niveles intracelulares de citocinas de TNF α , IFN γ e IL-2 evaluados mediante citometría de flujo de linfocitos T CD4+ o CD8+ presentes en una composición descongelada que contiene linfocitos T que expresan un CAR procedente de FMC63 que se había expandido en cultivo con células K562 que expresaban CD19 o con PMA/ionomicina. Se muestran los niveles de citocinas en los linfocitos T CD4+ y CD8+, solos o como cocultivo, en la descongelación (d = 0) o después de un cultivo adicional durante 9 días más en presencia de perlas conjugadas con anti ID B-1.

La **figura 19B** muestra la frecuencia de células positivas para CD25 o Ki67 según se evaluó mediante citometría de flujo de linfocitos T CD4+ o CD8+ presentes en una composición descongelada que contiene linfocitos T que expresan un CAR procedente de FMC63 que se había expandido en cultivo con células K562 que expresaban CD19 o con PMA/ionomicina. Se muestran los niveles de los marcadores en linfocitos T CD4+ y CD8+, solos o como cocultivo, en la descongelación (d = 0) o después de un cultivo adicional durante 9 días más en presencia de perlas conjugadas con anti ID B-1.

La **figura 20A** muestra los resultados de la actividad citolítica específica del antígeno CAR y la **figura 20B** muestra los resultados de la producción de citocinas para linfocitos T con CAR anti BCMA que se habían estimulado previamente con perlas de BCMA (en comparación con linfocitos T con CAR anti BCMA recién descongelados (no estimulados previamente)) en los cocultivos, comparando las células cultivadas en presencia frente en ausencia de lenalidomida. La **figura 20C** muestra la viabilidad general y el recuento celular evaluados para tres donantes de T con CAR anti BCMA. La **figura 20D** muestra los resultados del análisis citométrico de flujo de la expresión superficial de CD25 y PD-1 (intensidad fluorescente media (MFI), para los linfocitos T con CAR anti BCMA CD4+ y CD8+ después de la estimulación (pretratamiento) con perlas de BCMA durante 7 días, en presencia o ausencia de lenalidomida 1 μ M. La **figura 20E** muestra el análisis citométrico de flujo en donantes de linfocitos T con CAR para la intensidad de fluorescencia media (MFI; CD25 y Tim3) o el porcentaje de PD-1 y Lag3 positivos en la superficie de los marcadores de linfocitos T en los subconjuntos CD4+ CAR+ y CD8+ CAR+ (seleccionados en células CD3+ vivas). Los valores mostrados son el porcentaje de referencia (Veh), MFI, la viabilidad o el recuento. La **figura 21A** muestra el análisis de la producción de citocinas efectoras después de la estimulación específica de CAR en perlas de 50 μ g de BCMA durante 24 horas en presencia de lenalidomida 1 μ M en comparación con la respuesta de referencia (vehículo) para cada de tres donantes.

La **figura 21B** muestra los efectos de los linfocitos T con CAR anti BCMA activados en diferentes concentraciones de perlas de BCMA (es decir, 5 μ g, 50 μ g y 200 μ g) en ausencia (barras de la izquierda) o presencia de 0,1 μ M (barra central) o 1 μ M (barras de la derecha) de lenalidomida en la producción de citocinas efectoras de los linfocitos T con CAR.

La **figura 21C** muestra la producción de citocinas de los linfocitos T con CAR anti BCMA procedentes de donantes sanos representativos y pacientes con mieloma múltiple estimulados en perlas de BCMA con o sin adición de PD-L1 en las perlas, en presencia o ausencia de lenalidomida 1 μ M.

Las **figuras 22A y 22B** presentan gráficos que muestran la producción de citocinas en linfocitos T que expresan CAR anti BCMA. La **figura 22A** representa la concentración (pg/ml) de IFN-gamma, IL-2, TNF-alfa, IL-6, GM-CSF e IL-4 en el sobrenadante recogido de linfocitos T que expresan CAR anti BCMA después de una incubación de 24 horas con perlas conjugadas con anticuerpos anti CD3/anti CD28 (CD3/CD28), perlas conjugadas con BCMA con una concentración de 200 μ g/ml, 50 μ g/ml o 5 μ g/ml de BCMA conjugado por aproximadamente 4×10^8 perlas (200 μ g, 50 μ g o 5 μ g de BCMA, respectivamente), o células incubadas sin perlas (sin estim.). Las líneas horizontales discontinuas indican el límite superior de cuantificación (ULOQ, por sus siglas en inglés). La **figura**

22B representa el porcentaje de células CD4+CAR+ (fila superior) o CD8+CAR+ (fila inferior) positivas para la tinción intracelular de IFN-gamma, IL-2 o TNF-alfa después de la incubación con perlas CD3/CD28, 200 µg, 50 µg o 5 µg de perlas conjugadas con BCMA o sin estim.

Las **figuras 23A y 23B** presentan gráficos que muestran la actividad de composiciones de linfocitos T que contienen linfocitos T con CAR+ anti CD19. Las células se incubaron con perlas conjugadas con anticuerpo anti CD19 anti ID durante 14 días (día 14; secundarias) o no se incubaron antes de evaluar la actividad. Se muestran los resultados de un ensayo de citotoxicidad (**figura 23A**) y un ensayo de tinción intracelular de citocinas (ICS) después de la exposición a células que expresan CD19 (**figura 23B**).

Las **figuras 24A-24C** presentan gráficos que muestran las características de composiciones de linfocitos T que contienen linfocitos T con CAR+ anti CD19 durante o después de la incubación con perlas conjugadas con anticuerpo anti CD19 anti ID durante 14 días. Se muestran los resultados de composiciones de linfocitos T que se generaron en presencia de diferentes compuestos de prueba o un vehículo. Las **figuras 24A y 24B** muestran la actividad en respuesta a la exposición a células CD19 de composiciones de linfocitos T que no se incubaron (primarias) o se incubaron durante 14 días (secundarias). Se muestran los resultados de la tinción polifuncional por ICS (**figura 24A**) y una actividad citolítica (**figura 24B**) después de la exposición a células que expresan CD19. La **figura 24C** representa los niveles de citocina secretada del sobrenadante de composiciones celulares que contienen células que expresan CAR anti CD19 que se incubaron en una relación de 1:1 con células que expresan CD19 durante 20 horas. Se midieron las cantidades de IL2, TNF e IFN-gamma y se muestra el promedio de las puntuaciones escaladas para las tres citocinas.

Las **figuras 25A-25D** muestran gráficos que muestran la actividad de los linfocitos T a partir de composiciones de linfocitos T con CAR anti CD19 generadas que se expandieron en presencia de medio solamente, control de vehículo DMSO, Compuesto 1 o Compuesto 2 después de la estimulación con perlas conjugadas en la superficie con anticuerpo antiidiotipo específico para el CAR anti CD19. La **figura 25A** muestra el recuento de linfocitos T vivos en total por pocillo de linfocitos T a partir de composiciones de linfocitos T con CAR anti CD19 generadas cocultivadas con perlas conjugadas en la superficie con el anticuerpo antiidiotipo. La **figura 25B** muestra el área bajo la curva (AUC) calculada para el recuento de linfocitos T vivos en relación con los controles de medio solamente. La **figura 25C** muestra un gráfico que muestra la producción de TNF-alfa (TNF), IFN-gamma (IFNg) e IL-2 por parte de los linfocitos T a partir de composiciones de linfocitos T con CAR anti CD19 generadas tras la estimulación con un cocultivo de 16 horas con células diana K562-CD19 irradiadas que siguió a una incubación de 15 días con perlas conjugadas en la superficie con el anticuerpo antiidiotipo. Se muestra el factor de cambio de TNF-alfa (TNF), IFN-gamma (IFNg) e IL-2 extracelulares en comparación con la condición de medio solamente. La **figura 25D** muestra gráficos que representan los perfiles de citocinas polifuncionales de los linfocitos T CD8+ a partir de composiciones de linfocitos T con CAR anti CD19 generadas que siguieron a una incubación de 15 días con perlas conjugadas con el anticuerpo antiidiotipo.

Descripción detallada

Las realizaciones de la invención se encuentran dentro de algunos de los casos divulgados en el presente documento. Cualquier referencia en el presente documento a métodos de tratamiento pretende referirse a productos para su uso en dichos métodos.

En el presente documento se divulgan composiciones y métodos para enriquecer, expandir y/o activar células genomanipuladas que expresan un receptor recombinante, por ejemplo, un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunos casos divulgados en el presente documento, los métodos divulgados incluyen el enriquecimiento, la expansión y/o la activación *ex vivo* o *in vitro* de células mediante incubación con una partícula, por ejemplo, una partícula de perla, con una molécula de unión unida que reconoce o se une al receptor recombinante. En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión unida es un polipéptido, por ejemplo, un antígeno polipéptido o un anticuerpo antiidiotipo que se une al receptor recombinante.

En algunos casos divulgados en el presente documento, las composiciones y métodos divulgados en el presente documento poseen una o más ventajas sobre los medios existentes para expandir, enriquecer o activar células que expresan un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR. Muchos protocolos existentes para la expansión *ex vivo* o *in vitro* se basan en la incubación de las células, por ejemplo, linfocitos T, con una o más moléculas estimuladoras policlonales capaces de activar componentes del complejo TCR. Por ejemplo, un protocolo común para expandir células es incubar las células con anticuerpos anti CD3 y anti CD28, por ejemplo, incubando las células con anticuerpos anti CD3 y anti CD28 que están unidos a perlas paramagnéticas. Un inconveniente de este método es que todas o la mayoría de las células de una composición determinada, por ejemplo, linfocitos T cultivados, entrarán en contacto y serán estimulados por los anticuerpos. Por lo tanto, en algunos casos divulgados en el presente documento, para una composición determinada de células en contacto con anticuerpos anti CD3 y anti CD28, todas o la mayoría de las células se activan independientemente de si expresan o no el receptor recombinante. En cambio, en casos particulares divulgados en el presente documento, cuando las células se incuban con las partículas, por ejemplo, perlas, divulgadas en el presente documento, las moléculas de unión de las partículas, por ejemplo, perlas, se unen directamente al receptor recombinante, lo que da como resultado una mayor estimulación, activación, proliferación y/o expansión en las células que expresan el receptor recombinante en comparación con las células que carecen del receptor. En algunos casos divulgados en el presente documento, la incubación de las células que incluyen células que expresan un receptor recombinante con las partículas, por ejemplo, perlas, divulgadas en el presente documento aumenta la

porción, la fracción o el subconjunto de las células que expresan el receptor recombinante.

En casos particulares divulgados en el presente documento, una ventaja de expandir, enriquecer y/o activar las células con las partículas, por ejemplo, perlas, divulgadas en el presente documento en comparación con otros métodos, por ejemplo, estimulación con anticuerpos anti CD3 y anti CD28, es que la incubación con las partículas divulgadas en el presente documento da como resultado una menor activación y/o agotamiento en comparación con las células que se expanden, se enriquecen y/o se activan mediante otros métodos. Por ejemplo, en algunos casos divulgados en el presente documento, las células incubadas con las partículas divulgadas en el presente documento expresan niveles más bajos de marcadores asociados con la activación, por ejemplo, la expresión superficial de CD25, o el agotamiento, por ejemplo, la expresión de PD1, en comparación con las células que se incuban con moléculas estimuladoras policlonales capaces de activar componentes del complejo TCR, por ejemplo, anticuerpos anti CD3 y anti CD28.

En determinados casos, se divulgan en el presente documento métodos para transducir o transfectar células con un vector vírico o no vírico para suministrar un ácido nucleico que codifica un receptor recombinante o CAR con respecto a las células mientras están en contacto, se tratan o se incuban con las partículas, por ejemplo, perlas, divulgadas en el presente documento al menos para la porción del proceso de transducción o transfección. En algunos casos divulgados en el presente documento, una ventaja de transducir o transfectar las células en presencia de las partículas, por ejemplo, perlas, permite la transfección o transducción de células que no se han activado previamente con moléculas estimuladoras policlonales, por ejemplo, anticuerpos anti CD3 y anti CD28. Los casos particulares divulgados en el presente documento contemplan que las células que se transducen o se transfectan sin activación previa con moléculas policlonales exhibirán una mayor persistencia y/o un agotamiento reducido en comparación con las células que se activaron antes de la transfección o la transducción.

Los casos particulares divulgados en el presente documento contemplan que antígenos recombinantes particulares, o fragmentos de los mismos, unidos a partículas, por ejemplo, perlas, como se describe, pueden ser particularmente adecuados para usos con el fin estimular específicamente un CAR que contiene un dominio de unión a antígeno que reconoce el antígeno. En algunos casos, determinados antígenos recombinantes, por ejemplo, BCMA, pueden tener pocas o ninguna interacción no específica, tales como interacciones proteína-proteína no específicas o interacciones no específicas con células que evitan o minimizan que el antígeno se adhiera de manera no específica a las células o que las células lo absorban. En algunos casos, esto puede mejorar la calidad de la estimulación de las células que expresan CAR. En algunos casos divulgados en el presente documento, la unión a perlas o partículas da como resultado una estimulación, activación o expansión de células aumentada, mejorada, consistente y/o más fiable en comparación con cuando el antígeno recombinante no está unido o está unido a un soporte sólido diferente, tal como la superficie de una placa o plato. En determinados casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión es o incluye BCMA recombinante o un fragmento del mismo.

En casos particulares divulgados en el presente documento, se usan partículas o perlas que contienen BCMA recombinante unido (tal como una fusión BCMA-FC recombinante) junto con los métodos divulgados para activar, estimular o expandir células de una composición celular. En algunos casos divulgados en el presente documento, las partículas o perlas que contienen el BCMA recombinante activan, estimulan o expanden selectivamente las células que expresan un receptor recombinante que contiene un dominio de unión a antígeno que se une a o reconoce BCMA, por ejemplo, un CAR anti BCMA. En determinados casos divulgados en el presente documento, la activación, la estimulación o la expansión de las células, por ejemplo, las células que expresan CAR anti BCMA, es mayor o aumenta en comparación con la activación, la estimulación o la expansión por otros reactivos, tales como, por ejemplo, reactivos de perlas conjugadas con anticuerpos anti CD3/anti CD28. En determinados casos divulgados en el presente documento, la activación, la estimulación o la expansión de las células, por ejemplo, las células que expresan CAR anti BCMA, es más indicativa de la activación, la estimulación o la expansión de las células *in vivo* y/o en respuesta al antígeno endógeno en comparación con la activación, la estimulación o la expansión por otros reactivos, tales como, por ejemplo, reactivos de perlas conjugadas con anticuerpos anti CD3/anti CD28. En algunos casos divulgados en el presente documento, el grado en el que las células se activan, se estimulan o se expanden por las partículas o perlas que contienen BCMA recombinante unido se puede ajustar, modificar o controlar alterando la cantidad de BCMA recombinante unido a las partículas o perlas o alterando la relación de partículas o perlas con respecto a las células. En algunos casos divulgados en el presente documento, la activación, la estimulación o la expansión de las células, por ejemplo, células que expresan CAR anti BCMA, por BCMA recombinante es más eficaz cuando el BCMA recombinante está unido a partículas o perlas que cuando el BCMA recombinante flota libremente o no está unido, o que cuando el BCMA recombinante está unido a una superficie diferente, por ejemplo, un plato o placa de cultivo.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión es un anticuerpo antiidiotipo (anti ID) que se une a o reconoce un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR. En casos particulares divulgados en el presente documento, se usan partículas o perlas que contienen anti ID recombinantes unidos junto con los métodos divulgados para activar, estimular o expandir células de una composición celular. En diversos casos divulgados en el presente documento, las partículas o perlas que contienen anti ID activan, estimulan o expanden selectivamente las células de la composición, tales como células que expresan el receptor recombinante, por ejemplo, un CAR. En determinados casos divulgados en el presente documento, la activación, la estimulación o la expansión de las células, por ejemplo, células que expresan CAR, es mayor o aumenta en comparación con la activación, la estimulación o la expansión por otros reactivos, tales como, por ejemplo, reactivos de perlas conjugadas con anticuerpos anti CD3/anti

CD28. En determinados casos divulgados en el presente documento, el grado en el que las células se activan, se estimulan o se expanden por las partículas o perlas que contienen anti ID se puede ajustar, modificar o controlar alterando la cantidad de anti ID unidos a las partículas o perlas o alterando la relación de partículas o perlas con respecto a las células. En casos particulares divulgados en el presente documento, el anti ID es un anticuerpo anti CD19 anti ID. En casos particulares divulgados en el presente documento, la activación, la estimulación o la expansión de células que expresan CAR anti CD19 por partículas o perlas que contienen anticuerpos anti CD19 anti ID es mayor o aumenta en comparación con la activación, la estimulación o la expansión por otros reactivos, tales como, por ejemplo, reactivos de perlas conjugadas con anticuerpos anti CD3/anti CD28.

En algunos casos divulgados en el presente documento, las composiciones y métodos divulgados expanden y activan linfocitos T genomanipulados que expresan receptores recombinantes o CAR, que, cuando se administran a un sujeto, exhiben una mayor persistencia y/o un menor agotamiento en comparación con los linfocitos T genomanipulados que se expanden mediante otras técnicas. En algunos casos divulgados en el presente documento, los linfocitos T genomanipulados con una mayor persistencia y/o un menor agotamiento exhiben una mejor potencia en un sujeto al que se administran.

Los títulos de sección usados en el presente documento son solo para fines organizativos y no deben interpretarse como limitantes de la materia objeto descrita.

I. CONJUGADOS DE PARTÍCULAS

En el presente documento se divulgan partículas, tales como perlas, que están conjugadas o unidas de otro modo a una molécula de unión que se une a o se reconoce por un dominio de unión a antígeno de un receptor recombinante, tal como un receptor de antígeno quimérico (CAR) y métodos para su uso de las mismas. En algunos casos divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, son partículas no celulares.

A. Partículas

En algunos casos divulgados en el presente documento, una molécula de unión que se une a o es reconocida por un dominio de unión a antígeno de un receptor recombinante, tal como un receptor de antígeno quimérico (CAR), está unida a o unida de otro modo a una partícula (por ejemplo, partículas de perlas), por ejemplo, a la superficie de la partícula. En determinados casos divulgados en el presente documento, la partícula es una partícula no celular. En casos particulares divulgados en el presente documento, la partícula puede incluir una partícula coloidal, una microesfera, nanopartícula, una perla, tal como una perla magnética o similares. En algunos casos divulgados en el presente documento, las partículas o perlas son biocompatibles, es decir, no tóxicas. En determinados casos divulgados en el presente documento, las partículas o perlas no son tóxicas para las células cultivadas, por ejemplo, linfocitos T cultivados. En casos particulares divulgados en el presente documento, las partículas son monodispersas. En determinados casos divulgados en el presente documento, "monodispersas" abarca partículas (por ejemplo, partículas de perlas) con dispersiones de tamaño que tienen una desviación estándar de menos del 5 %, por ejemplo, que tienen una desviación estándar de diámetro de menos del 5 %.

En algunos casos divulgados en el presente documento, una partícula descrita en el presente documento (por ejemplo, una partícula de perla) proporciona un soporte sólido o una matriz a la que una molécula de unión, tal como una molécula de unión descrita en el presente documento (por ejemplo, un antígeno o un anticuerpo), se puede unir o fijar de una manera que permita una interacción entre la molécula de unión y una célula, en particular la unión entre la molécula de unión y un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR, expresado en la superficie de la célula. En casos particulares divulgados en el presente documento, la interacción entre la molécula de unión conjugada o fijada y la célula se puede usar en métodos para facilitar el enriquecimiento, la activación, la estimulación y/o la expansión de uno o más tipos de células en una población celular en función de la expresión o el nivel de expresión de uno o más receptores recombinantes en la superficie de una célula. En determinados casos divulgados en el presente documento, la partícula (por ejemplo, una partícula de perla) comprende una o más moléculas de unión (por ejemplo, un anticuerpo o un antígeno) que se unen a una región de unión a antígeno de un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR que se expresa en la superficie de la célula.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la partícula o perla es biocompatible, es decir, está compuesta por un material que es adecuado para uso biológico. En algunos casos divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, no son tóxicas para las células cultivadas, por ejemplo, linfocitos T cultivados. En algunos casos divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, pueden ser cualquier partícula que sea capaz de unir moléculas de unión de una manera que permita una interacción entre la molécula de unión y una célula. En determinados casos divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, pueden ser cualquier partícula que se pueda modificar, por ejemplo, funcionalizarse superficialmente, para permitir la unión de una molécula de unión en la superficie de la partícula. En algunos casos divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, están compuestas por vidrio, sílice, poliésteres de ácidos hidroxycarboxílicos, polianhídridos de ácidos dicarboxílicos o copolímeros de ácidos hidroxycarboxílicos y ácidos dicarboxílicos. En algunos casos divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, pueden estar compuestas o al menos parcialmente compuestas por poliésteres de hidroxiácidos alquenoil, haloalquilo, tioalquilo, aminoalquilo, arilo,

- aralquilo, alqueno, alqueno, heteroalquilo o alcoxi de cadena lineal o ramificada, sustituidos o sin sustituir, saturados o insaturados, lineales o reticulados, o polianhídridos de ácido alqueno, haloalquilo, tioalquilo, aminoalquilo, aril, alquilo, alqueno, alqueno, heteroalquilo o alcoxidicarboxílicos de cadena lineal o ramificada, sustituidos o sin sustituir, saturados o insaturados, lineales o reticulados. Además, las partículas, por ejemplo, perlas, pueden ser puntos cuánticos o estar compuestas por puntos cuánticos, tales como partículas de poliestireno de puntos cuánticos, por ejemplo, perlas. También se pueden emplear partículas, por ejemplo, perlas, que incluyan mezclas de enlaces éster y anhídrido (por ejemplo, copolímeros de ácido glicólico y sebácico). Por ejemplo, las partículas, por ejemplo, perlas, pueden comprender materiales que incluyen polímeros de ácido poliglicólico (PGA), polímeros de ácido poliláctico (PLA), polímeros de ácido polisebácico (PSA), copolímeros de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), copolímeros de ácido [rho]poli(láctico-co-sebácico) (PLSA), copolímeros de ácido poli(glicólico-co-sebácico) (PGSA), etc. Otros polímeros de los que pueden estar compuestas las partículas, por ejemplo, perlas, incluyen polímeros o copolímeros de caprolactonas, carbonatos, amidas, aminoácidos, ortoésteres, acetales, cianoacrilatos y uretanos degradables, así como copolímeros de estos con ácidos alqueno, haloalquilo, tioalquilo, aminoalquilo, alqueno hidroxilo o dicarboxílicos de cadena lineal o ramificada, sustituidos o sin sustituir. Además, los aminoácidos biológicamente importantes con grupos reactivos en la cadena lateral, tales como lisina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, treonina, tirosina y cisteína, o sus enantiómeros, pueden incluirse en copolímeros con cualquiera de los materiales mencionados anteriormente para proporcionar grupos reactivos para la conjugación con moléculas de unión tales como antígenos polipeptídicos o anticuerpos.
- En algunos casos divulgados en el presente documento, las partículas o perlas tienen un diámetro superior a 0,001 μm , superior a 0,01 μm , superior a 0,05 μm , superior a 0,1 μm , superior a 0,2 μm , superior a 0,3 μm , superior a 0,4 μm , superior a 0,5 μm , superior a 0,6 μm , superior a 0,7 μm , superior a 0,8 μm , superior a 0,9 μm , superior a 1 μm , superior a 2 μm , superior a 3 μm , superior a 4 μm , superior a 5 μm , superior a 6 μm , superior a 7 μm , superior a 8 μm , superior a 9 μm , superior a 10 μm , superior a 20 μm , superior a 30 μm , superior a 40 μm , superior a 50 μm , superior a 100 μm , superior a 500 μm y/o superior a 1.000 μm . En algunos casos divulgados en el presente documento, las partículas o perlas tienen un diámetro de entre o entre aproximadamente 0,001 μm y 1.000 μm , 0,01 μm y 100 μm , 0,1 μm y 10 μm , 0,1 μm y 100 μm , 0,1 μm y 10 μm , 0,001 μm y 0,01 μm , 0,01 μm y 0,1 μm , 0,1 μm y 1 μm , 1 μm y 10 μm , 1 μm y 2 μm , 2 μm y 3 μm , 3 μm y 4 μm , 4 μm y 5 μm , 1 μm y 5 μm , y/o 5 μm y 10 μm , cada uno inclusive. En determinados casos divulgados en el presente documento, las partículas o perlas tienen un diámetro medio de 1 μm y 10 μm , cada uno inclusive. En determinados casos divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, tienen un diámetro de o de aproximadamente 1 μm . En casos particulares divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, tienen un diámetro medio de o de aproximadamente 2,8 μm . En algunos casos divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, tienen un diámetro de o de aproximadamente 4,8 μm .
- En determinados casos divulgados en el presente documento, una pluralidad de las partículas, por ejemplo, perlas, tiene un tamaño de partícula uniforme. En algunos casos divulgados en el presente documento, un tamaño de partícula uniforme comprende una desviación estándar de diámetro de menos del 10 %, menos del 5 % o menos del 1 % del diámetro medio de la pluralidad. En casos particulares divulgados en el presente documento, la pluralidad de las partículas, por ejemplo, perlas, tiene una desviación estándar de diámetro de menos del 10 %, menos del 5 % o menos del 1 % del diámetro medio de la pluralidad.
- En casos particulares divulgados en el presente documento, las partículas (por ejemplo, partículas de perlas) tienen una forma uniforme. En algunos casos divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, son esféricas. En determinados casos divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, no son esféricas.
- En algunos casos divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, tienen una densidad superior a 0,001 g/cm^3 , superior a 0,01 g/cm^3 , superior a 0,05 g/cm^3 , superior a 0,1 g/cm^3 , superior a 0,5 g/cm^3 , superior a 0,6 g/cm^3 , superior a 0,7 g/cm^3 , superior a 0,8 g/cm^3 , superior a 0,9 g/cm^3 , superior a 1 g/cm^3 , superior a 1,1 g/cm^3 , superior a 1,2 g/cm^3 , superior a 1,3 g/cm^3 , superior a 1,4 g/cm^3 , superior a 1,5 g/cm^3 , superior a 2 g/cm^3 , superior a 3 g/cm^3 , superior a 4 g/cm^3 o superior a 5 g/cm^3 . En algunos casos divulgados en el presente documento, las partículas o perlas tienen una densidad de entre o entre aproximadamente 0,001 g/cm^3 y 100 g/cm^3 , 0,01 g/cm^3 y 50 g/cm^3 , 0,1 g/cm^3 y 10 g/cm^3 , 0,1 g/cm^3 y 0,5 g/cm^3 , 0,5 g/cm^3 y 1 g/cm^3 , 0,5 g/cm^3 y 1,5 g/cm^3 , 1 g/cm^3 y 1,5 g/cm^3 , 1 g/cm^3 y 2 g/cm^3 , o 1 g/cm^3 y 5 g/cm^3 . En algunos casos divulgados en el presente documento, las partículas o perlas tienen una densidad de, de al menos, o de aproximadamente 0,5 g/cm^3 , 0,5 g/cm^3 , 0,6 g/cm^3 , 0,7 g/cm^3 , 0,8 g/cm^3 , 0,9 g/cm^3 , 1,0 g/cm^3 , 1,1 g/cm^3 , 1,2 g/cm^3 , 1,3 g/cm^3 , 1,4 g/cm^3 , 1,5 g/cm^3 , 1,6 g/cm^3 , 1,7 g/cm^3 , 1,8 g/cm^3 , 1,9 g/cm^3 o 2,0 g/cm^3 , cada uno inclusive. En determinados casos divulgados en el presente documento, las perlas o partículas tienen una densidad de o de aproximadamente 1,6 g/cm^3 . En casos particulares divulgados en el presente documento, las perlas o partículas tienen una densidad de o de aproximadamente 1,5 g/cm^3 . En determinados casos divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, tienen una densidad de o de aproximadamente 1,3 g/cm^3 .
- En determinados casos divulgados en el presente documento, una pluralidad de las partículas o perlas tiene una densidad uniforme. En determinados casos divulgados en el presente documento, una densidad uniforme comprende una desviación estándar de densidad de menos del 10 %, menos del 5 % o menos del 1 % de la densidad de partícula media.

En algunos casos divulgados en el presente documento, las partículas o perlas tienen un área superficial de entre o entre aproximadamente 0,001 m² por cada gramo de partículas, por ejemplo, perlas, (m²/g) y 1.000 m²/g, 0,010 m²/g y 100 m²/g, 0,1 m²/g y 10 m²/g, 0,1 m²/g y 1 m²/g, 1 m²/g y 10 m²/g, 10 m²/g y 100 m²/g, 0,5 m²/g y 20 m²/g, 0,5 m²/g y 5 m²/g, o 1 m²/g y 4 m²/g, cada uno inclusive. En algunos casos divulgados en el presente documento, las partículas o perlas tienen un área superficial de o de aproximadamente 1 m²/g a 4 m²/g.

En casos particulares divulgados en el presente documento, las partículas (por ejemplo, partículas de perlas) tienen una gravedad específica, es decir, la relación de la densidad de las partículas, por ejemplo, perlas, con respecto a la densidad del agua, de entre o entre aproximadamente 0,01 y 100, 0,1 y 10, 0,5 y 5, 1 y 10, 1 y 2, 1,1 y 1,8, o 1,2 y 1,5, cada uno inclusive. En determinados casos divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, tienen una gravedad específica de 1,2 y 1,5. En determinados casos divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, son monodispersas y la gravedad específica es uniforme. En casos particulares divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, con una gravedad específica uniforme tienen una desviación estándar de la gravedad específica de menos del 10 %, menos del 5 % o menos del 1 %. En diversos casos divulgados en el presente documento, las partículas son monodispersas y tienen una gravedad específica con una desviación estándar de menos del 10 %, menos del 5 % o menos del 1 %.

En determinados casos divulgados en el presente documento, la superficie de la partícula comprende biomoléculas unidas que pueden unirse o unir moléculas de unión. En casos particulares divulgados en el presente documento, las biomoléculas son polipéptidos. En algunos casos divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, comprenden proteína A, proteína G o biotina expuestas en la superficie.

En algunos de los casos divulgados en el presente documento, la partícula contiene una o más capas o revestimientos, tales como una o más capas o revestimientos en la superficie de la partícula (por ejemplo, un revestimiento de superficie). En algunos casos divulgados en el presente documento, la una o más capas o revestimientos proporcionan un material para la conjugación o acoplamiento a una molécula de unión, por ejemplo, una capa que está funcionalizada o es capaz de funcionalizarse superficialmente. En determinados casos divulgados en el presente documento, la capa comprende, o es capaz de unir, grupos funcionales expuestos en la superficie. En casos particulares divulgados en el presente documento, el revestimiento comprende, o es capaz de unir, grupos carboxilo, grupos amino, grupos hidroxilo, grupos tosilo, grupos epoxi, grupos clorometilo o combinaciones de los mismos expuestos en la superficie. En algunos casos divulgados en el presente documento, la capa o revestimiento es hidrófobo. En casos particulares divulgados en el presente documento, la capa o revestimiento no es hidrófoba.

1. Partículas magnéticas

En algunos casos divulgados en el presente documento, la partícula (por ejemplo, partícula de perla) reacciona en un campo magnético. En algunos casos divulgados en el presente documento, la partícula es una partícula magnética (por ejemplo, partícula de perlas magnéticas). En algunos casos divulgados en el presente documento, la partícula magnética es paramagnética. En casos particulares divulgados en el presente documento, la partícula magnética es superparamagnética. En determinados casos divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, no muestran ninguna propiedad magnética a menos que estén expuestas a un campo magnético.

En casos particulares divulgados en el presente documento, la partícula puede ser una partícula compuesta que contiene un núcleo interno. En algunos casos divulgados en el presente documento, el núcleo interno es un núcleo magnético, un núcleo paramagnético o un núcleo superparamagnético. En algunos casos divulgados en el presente documento, el núcleo interno (por ejemplo, el núcleo magnético) es o contiene un metal. En algunos casos divulgados en el presente documento, el metal puede ser, pero sin limitación, hierro, níquel, cobre, cobalto, gadolinio, manganeso, tántalo, cinc, circonio o cualquier combinación de los mismos. Las sustancias adecuadas que pueden incluirse en un núcleo interno descrito en el presente documento (por ejemplo, un núcleo magnético) incluyen, pero sin limitación, óxidos metálicos (por ejemplo, óxidos de hierro), ferritas (por ejemplo, ferritas de manganeso, ferritas de cobalto, ferritas de níquel, etc.), hematita y aleaciones metálicas (por ejemplo, CoTaZn). En algunos casos divulgados en el presente documento, el núcleo interno comprende uno o más de una ferrita, un metal, una aleación metálica, un óxido de hierro o dióxido de cromo. En algunos casos divulgados en el presente documento, el núcleo interno comprende hierro elemental o un compuesto del mismo. En algunos casos divulgados en el presente documento, el núcleo interno comprende uno o más de magnetita (Fe₃O₄), maghemita (γ-Fe₂O₃) o greigita (Fe₃S₄). En algunos casos divulgados en el presente documento, el núcleo interno comprende un óxido de hierro (por ejemplo, Fe₃O₄).

En determinados casos divulgados en el presente documento, la partícula contiene un núcleo magnético, paramagnético y/o superparamagnético que está cubierto por una capa o revestimiento funcionalizado superficialmente. En algunos casos divulgados en el presente documento, la partícula comprende grupos tosilo expuestos en la superficie.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la capa puede contener un material que puede incluir, pero sin limitación, un polímero, un polisacárido, una sílice, un ácido graso, una proteína, un carbono o una combinación de los mismos. En algunos casos divulgados en el presente documento, el polímero puede ser un polietilenglicol,

poli(ácido láctico-co-glicólico), poliglutaraldehído, poliuretano, poliestireno o un alcohol polivinílico. En determinados casos divulgados en el presente documento, la capa o revestimiento exterior comprende poliestireno. En algunos casos divulgados en el presente documento, la capa contiene o incluye un material que es o incluye una proteína que es una albúmina (por ejemplo, seroalbúmina humana), proteína A y proteína G. En algunos casos divulgados en el presente documento, el carbono es una acrilamida o ácido maleico. En algunos casos divulgados en el presente documento, el material está acoplado, unido o conjugado a una molécula de unión descrita en el presente documento.

En algunos casos divulgados en el presente documento, una partícula descrita en el presente documento (por ejemplo, una partícula de perla) puede tener un núcleo interno y una capa (por ejemplo, capa protectora) en donde la capa contiene uno o más materiales descritos en el presente documento. En algunos casos divulgados en el presente documento, la capa es hidrófoba. En determinados casos divulgados en el presente documento, la capa es hidrófila. En algunos casos divulgados en el presente documento, una partícula descrita en el presente documento (por ejemplo, una partícula de perla) tiene un núcleo de óxido de metal (por ejemplo, un núcleo interno de óxido de hierro) y una capa (por ejemplo, una capa protectora), en donde la capa comprende poliestireno.

Las partículas (por ejemplo, partículas de perla) usadas en los métodos descritos en el presente documento se pueden producir u obtener comercialmente. Las partículas, por ejemplo, perlas, incluyendo los métodos de producción de partículas, por ejemplo, perlas, se conocen bien en la técnica. Véanse, por ejemplo, las Pat. de EE. UU. N.º 6.074.884; 5.834.121; 5.395.688; 5.356.713; 5.318.797; 5.283.079; 5.232.782; 5.091.206; 4.774.265; 4.654.267; 4.554.088; 4.490.436; 4.452.773; la publicación de solicitud de patente de EE. UU. N.º 20100207051; y Sharpe, Pau T., Methods of Cell Separation, Elsevier, 1988. Las partículas disponibles comercialmente, por ejemplo, perlas, (por ejemplo, partículas de perlas) incluyen, pero sin limitación, ProMagTM (PolySciences, Inc.); COMPELTM (PolySciences, Inc.); BioMag® (PolySciences, Inc.), incluyendo BioMag® Plus (PolySciences, Inc.) y BioMag® Maxi (Bang Laboratories, Inc.); M-PVA (Cehmagen Biopolymer Technologie AG); SiMAG (Chemicell GmbH); beadMAG (Chemicell GmbH); MagaPhase® (Cortex Biochem); Dynabeads® (Invitrogen), incluyendo anti IgG de oveja Dynabeads® M-280 (Invitrogen), Dynabeads® FlowCompTM (por ejemplo, Dynabeads® FlowCompTMHuman CD3, Invitrogen), Dynabeads® M-450 (por ejemplo, Dynabeads® M-450 Tosylactivated, Invitrogen), Dynabeads® UntouchedTM (por ejemplo, linfocitos T CD8 humanos Dynabeads® UntouchedTM, Invitrogen) y Dynabeads® que se unen, expanden y/o activan linfocitos T (por ejemplo, Activador T humano CD3/CD28 Dynabeads® para la expansión y activación de linfocitos T, Invitrogen); Estapor® M (Merk Chimie SAS); Estapor® EM (Merk Chimie SAS); partículas MACSiBeadsTM (por ejemplo, partículas MACSiBead anti biotina, Miltenyi Biotec, n.º de catálogo 130-091-147); perlas magnéticas Streptamer® (IBA BioTAGnology); perlas magnéticas Strep-Tactin® (IBA BioTAGnology); Sicastar®-M (Micromod Partikeltechnologie GmbH) Micromer®-M (Micromod Partikeltechnologie); MagneSilTM (Promega GmbH); MGP (Roche Applied Science Inc.); perlas magnéticas de proteína G Pierce™ (Thermo Fisher Scientific Inc.); perlas magnéticas de proteína A Pierce™ (Thermo Fisher Scientific Inc.); perlas magnéticas de proteína A/G Pierce™ (Thermo Fisher Scientific Inc.); perlas magnéticas activada con NHS Pierce™ (Thermo Fisher Scientific Inc.); perlas magnéticas de proteína L Pierce™ (Thermo Fisher Scientific Inc.); perlas magnéticas anti HA Pierce™ (Thermo Fisher Scientific Inc.); perlas magnéticas anti c-Myc Pierce™ (Thermo Fisher Scientific Inc.); perlas magnéticas de glutatión Pierce™ (Thermo Fisher Scientific Inc.); perlas magnéticas de estreptavidina Pierce™ (Thermo Fisher Scientific Inc.); perlas magnéticas MagnaBindTM (Thermo Fisher Scientific Inc.); perlas magnéticas Sera-MagTM (Thermo Fisher Scientific Inc.); perlas magnéticas Anti-FLAG® M2 (Sigma-Aldrich); perlas magnéticas SPHEROTM (Spherotech Inc.); y perlas magnéticas de Ni-NTA HisPurTM (Thermo Fisher Scientific Inc.).

En determinados casos divulgados en el presente documento, la partícula es una partícula de perlas superparamagnéticas monodispersas que comprende un núcleo de hierro superparamagnético, por ejemplo, un núcleo de magnetita (Fe_3O_4) o maghemita ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$), una capa o revestimiento de poliestireno y una superficie funcionalizada que comprende grupos tosilo expuestos. En determinados casos divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, tienen una densidad de aproximadamente $1,5 \text{ g/cm}^3$ y una superficie de aproximadamente $1 \text{ m}^2/\text{g}$ a aproximadamente $4 \text{ m}^2/\text{g}$. En casos particulares divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, son partículas superparamagnéticas monodispersas, por ejemplo, perlas, que tienen un diámetro de aproximadamente $4,5 \mu\text{m}$ y una densidad de aproximadamente $1,5 \text{ g/cm}^3$. En algunos casos divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, las partículas son partículas superparamagnéticas monodispersas que tienen un diámetro medio de aproximadamente $2,8 \mu\text{m}$ y una densidad de aproximadamente $1,3 \text{ g/cm}^3$.

2. Partículas de oligómero

En algunos casos divulgados en el presente documento, la partícula es un oligómero o polímero. En algunos casos divulgados en el presente documento, la partícula es un oligómero o un polímero compuesto por proteínas, por ejemplo, estreptavidina. En algunos casos divulgados en el presente documento, la partícula es un oligómero o polímero que se puede generar uniendo directa o indirectamente moléculas individuales de una proteína, por ejemplo, estreptavidina o una variante de la misma, tal como existe de forma natural, ya sea uniendo directa o indirectamente moléculas individuales de un monómero o un complejo de subunidades que constituyen una molécula individual (por ejemplo, uniendo directa o indirectamente dímeros, trímeros, tetrámeros, etc. de una proteína tal como existe de forma natural). Por ejemplo, un homodímero o heterodímero tetramérico de estreptavidina o avidina puede denominarse molécula individual o componente básico más pequeño de un oligómero o polímero respectivo. En algunos casos

- divulgados en el presente documento, el oligómero o polímero puede contener un enlace de al menos 2 moléculas individuales de la proteína (por ejemplo, es un 2-mero), o puede ser al menos un 3 meros, 4 meros, 5 meros, 6 meros, 7 meros, 8 meros, 9 meros, 10 meros, 11 meros, 12 meros, 13 meros, 14 meros, 15 meros, 16 meros, 17 meros, 18 meros, 19 meros, 20 meros, 25 meros, 30 meros, 35 meros, 40 meros, 45 meros o 50 meros de moléculas individuales de la proteína (por ejemplo, monómeros, tetrámeros). En algunos casos divulgados en el presente documento, el reactivo es un multímero, o el reactivo oligomérico es un reactivo multimérico. En casos particulares divulgados en el presente documento, la partícula es un oligómero o polímero que comprende estreptavidina o muteína de estreptavidina (por ejemplo, muteínas de estreptavidina STREP-TACTIN® o STREP-TACTIN® XT)
- Los oligómeros se pueden generar usando cualquier método conocido en la técnica, como cualquiera de los descritos en la solicitud de patente de EE. UU. N.º US2004/0082012. En algunos casos divulgados en el presente documento, el oligómero o polímero comprende dos o más moléculas individuales que pueden estar reticuladas, tal como mediante un polisacárido o un enlazador bifuncional.
- En algunos casos divulgados en el presente documento, la partícula es un oligómero o polímero que se obtiene reticulando moléculas individuales o un complejo de subunidades que constituyen una molécula individual en presencia de un polisacárido. En algunos casos divulgados en el presente documento, las partículas son oligómeros o polímeros que se pueden preparar mediante la introducción de residuos de carboxilo en un polisacárido, por ejemplo, dextrano. En algunos casos divulgados en el presente documento, las moléculas individuales de la partícula (por ejemplo, monómeros, tetrámeros) se pueden acoplar a través de grupos amino primario de residuos de lisina internos y/o el extremo N libre a los grupos carboxilo en la cadena principal de dextrano usando la química de carbodiimida convencional. En algunos casos divulgados en el presente documento, la reacción de acoplamiento se realiza en una relación molar de aproximadamente 60 moles de moléculas individuales del reactivo (por ejemplo, monómeros, tetrámeros) por mol de dextrano.
- En algunos casos divulgados en el presente documento, la partícula es un oligómero o un polímero de una o más estreptavidinas o avidinas o de cualquier análogo o muteína de estreptavidina (por ejemplo, Strep-Tactin® o Strep-Tactin® XT) o análogo o muteína de avidina (por ejemplo, neutravidina). En algunos casos divulgados en el presente documento, la avidina o estreptavidina comprende un sitio de unión Z que es un sitio de unión de biotina natural de avidina o estreptavidina para el cual puede haber hasta cuatro sitios de unión en una molécula individual (por ejemplo, un tetrámero contiene cuatro sitios de unión Z), por lo que un homotetrámero puede contener hasta 4 sitios de unión que son iguales, es decir, Z1, mientras que un heterotetrámero puede contener hasta 4 sitios de unión que pueden ser diferentes, por ejemplo, que contienen Z1 y Z2. En algunos casos divulgados en el presente documento, el oligómero se genera o se produce a partir de una pluralidad de moléculas individuales (por ejemplo, una pluralidad de homotetrámeros) de la misma estreptavidina, muteína de estreptavidina, avidina o muteína de avidina, en cuyo caso, cada sitio de unión Z, por ejemplo, Z1, del oligómero es el mismo. Por ejemplo, en algunos casos, un oligómero puede contener una pluralidad de sitios de unión Z1, tales como al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 40, 45, 50 o más sitios de unión Z1. En algunos casos divulgados en el presente documento, el oligómero se genera o se produce a partir de una pluralidad de moléculas individuales que pueden ser heterotetrámeros de una estreptavidina, muteína de estreptavidina, avidina o muteína de avidina y/o a partir de una pluralidad de dos o más moléculas individuales diferentes (por ejemplo, diferentes homotetrámeros) de estreptavidina, muteína de estreptavidina, avidina o muteína de avidina que difieren en sus sitios de unión Z, por ejemplo, Z1 y Z2, en cuyo caso puede estar presente una pluralidad de sitios de unión Z diferentes, por ejemplo, Z1 y Z2, en el oligómero. Por ejemplo, en algunos casos, un oligómero puede contener una pluralidad de sitios de unión Z1 y una pluralidad de sitios de unión Z, que, en combinación, puede incluir al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 40, 45, 50 o más sitios de unión combinados Z1 y Z2.
- En algunos casos divulgados en el presente documento, la partícula es un oligómero o polímero que se obtiene mediante la reticulación de moléculas individuales o un complejo de subunidades que constituyen una molécula individual usando un enlazador bifuncional u otro enlazador químico, tal como avidina o mediante otros métodos conocidos en la técnica. En algunos casos divulgados en el presente documento, los oligómeros o polímeros reticulados de estreptavidina o avidina o de cualquier muteína o análogo de estreptavidina o avidina pueden obtenerse mediante la reticulación de moléculas individuales de estreptavidina o avidina a través de moléculas bifuncionales, que sirven como enlazador, tal como glutaraldehído o mediante otros métodos descritos en la técnica. Por ejemplo, es posible generar oligómeros de muteínas de estreptavidina introduciendo grupos tiol en la muteína de estreptavidina (esto se puede hacer, por ejemplo, haciendo reaccionar la muteína de estreptavidina con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) y activando, por ejemplo, en una reacción separada, los grupos amino disponibles en la muteína de estreptavidina. En algunos casos divulgados en el presente documento, esta activación de los grupos amino se puede lograr mediante la reacción de la muteína de estreptavidina con un agente de reticulación heterobifuncional disponible comercialmente, tal como 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo (sulfo SMCC) o 6-[[[(3-maleimidopropionamido)hexanoato de succinimidilo (SMPH). En algunos de estos casos divulgados en el presente documento, los dos productos de reacción así obtenidos se mezclan entre sí, lo que típicamente conduce a la reacción de los grupos tiol contenidos en un lote de muteína de estreptavidina modificada con los aminoácidos activados (por ejemplo, mediante funciones maleimida) del otro lote de muteína de estreptavidina modificada. En algunos casos, mediante esta reacción, se forman multímeros/oligómeros de la muteína de estreptavidina. Estos oligómeros pueden

tener cualquier número adecuado de moléculas individuales, tales como al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 40, 45, 50 o más, y el grado de oligomerización puede variar según la condición de reacción.

- 5 En algunos casos divulgados en el presente documento, el reactivo oligomérico o polimérico se puede aislar mediante cromatografía de exclusión por tamaño y se puede usar cualquier fracción deseada como partícula. En algunos casos divulgados en el presente documento, después de hacer reaccionar la muteína de estreptavidina modificada en presencia de 2-iminotiolano y un agente de reticulación heterobifuncional tal como sulfo SMCC, el reactivo oligomérico o polimérico se puede aislar mediante cromatografía de exclusión por tamaño y se puede usar cualquier fracción deseada como partícula. En algunos casos divulgados en el presente documento, los oligómeros no tienen (y no necesitan tener) un único peso molecular, pero pueden observar una distribución de peso estadística tal como la distribución gaussiana. En algunos casos, se puede usar como partícula soluble cualquier oligómero con más de tres tetrámeros de estreptavidina o muteína, por ejemplo, homotetrámeros o heterotetrámeros, tales como generalmente de 3 a 50 tetrámeros, por ejemplo, homotetrámeros o heterotetrámeros, de 10 a 40 tetrámeros, por ejemplo, homotetrámeros o heterotetrámeros, o de 25 a 35 tetrámeros, por ejemplo, homotetrámeros o heterotetrámeros. Los oligómeros pueden tener, por ejemplo, de 3 a 25 tetrámeros de muteína de estreptavidina, por ejemplo, homotetrámeros o heterotetrámeros. En algunos casos divulgados en el presente documento, con un peso molecular de aproximadamente 50 kDa para las muteínas de estreptavidina, los oligómeros solubles pueden tener un peso molecular de o de aproximadamente 150 kDa a 2000 kDa, de 150 kDa a 1500 kDa, de 150 kDa a 1250 kDa, de 150 kDa a 1000 kDa, de 150 kDa a 500 kDa o de 150 kDa a 300 kDa, de 300 kDa a 2000 kDa, de 300 kDa a 1500 kDa, de 300 kDa a 1250 kDa, de 300 kDa a 1000 kDa, de 300 kDa a 500 kDa, de 500 kDa a 2000 kDa, de 500 kDa a 1500 kDa, de 500 kDa a 1250 kDa, de 500 kDa a 1000 kDa, de 1000 kDa a 2000 kDa, de 1000 kDa a 1500 kDa, de 1000 kDa a 1250 kDa, de 1250 kDa a 2000 kDa o de 1500 kDa a 2000 kDa. Generalmente, debido a que cada molécula/muteína de estreptavidina tiene cuatro sitios de unión de biotina, tal reactivo puede proporcionar de 12 a 160 sitios de unión Z, tal como de 12 a 100 sitios de unión Z.

B. Moléculas de unión

- 30 En el presente documento se divulgan moléculas de unión, por ejemplo, antígenos polipeptídicos o anticuerpos, que se unen o son reconocidas por un dominio de unión a antígeno de un receptor recombinante, tal como un CAR, que están conjugados o unidos a una partícula, por ejemplo, una partícula de perla. En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión es un polipéptido. En determinados casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión incluye cualquier polipéptido para el que un receptor recombinante, tal como un receptor de antígeno, por ejemplo, CAR, puede estar diseñado para su unión o reconocimiento. En casos particulares divulgados en el presente documento, la molécula de unión es un anticuerpo antiidiotipo que se une a o reconoce el dominio de unión a antígeno de un receptor recombinante, tal como un receptor de antígeno, por ejemplo, un CAR. En casos particulares divulgados en el presente documento, la molécula de unión es un polipéptido que está unido o es reconocido por el dominio de unión a antígeno de un receptor recombinante, tal como un receptor de antígeno, por ejemplo, un CAR. En determinados casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión es un polipéptido que está unido o es reconocido por el dominio de unión a antígeno de un CAR.

- En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión se une a o es reconocida por un CAR que no comprende un dominio transmembrana o un dominio de señalización intracelular de un receptor similar a la inmunoglobulina de linfocitos citotóxicos (KIR, por sus siglas en inglés). En determinados casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión se une a o es reconocida por un CAR que no comprende un dominio transmembrana o un dominio intracelular de ninguno de KIR2DS2, KIR2DL3, KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR2DS1, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DL1, KIR3DS1, KIR3DL2, KIR3DL3, KIR2DP1 y KIR3DP1.

50 1. Antígenos

- En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión es un antígeno, por ejemplo, un antígeno recombinante o fragmento del mismo. En determinados casos divulgados en el presente documento, el antígeno es un polipéptido, o una porción de un polipéptido, que está asociado con una enfermedad, por ejemplo, un cáncer. En algunos casos divulgados en el presente documento, el antígeno es un polipéptido, o una variante o fragmento de un polipéptido que se expresa en la superficie de una célula que está asociada con una enfermedad, por ejemplo, una célula neoplásica y/o una célula tumoral.

- En algunos casos divulgados en el presente documento, el antígeno es o incluye la integrina $\alpha\beta6$ (integrina $\alpha\text{v}\beta6$), antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA), B7-H3, B7-H6, anhidrasa carbónica 9 (CA9, también conocida como CAIX o G250), un antígeno del cáncer de testículo, antígeno 1B de cáncer/testículo (CTAG, también conocido como NY-ESO-1 y LAGE-2), antígeno carcinoembrionario (CEA), una ciclina, ciclina A2, ligando 1 de quimiocinas con motivo C-C (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, condroitín sulfato proteoglicano 4 (CSPG4), proteína del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), mutación del receptor del factor de crecimiento epidérmico de tipo III (EGFR VIII), glucoproteína 2 epitelial (EPG-2), glucoproteína 40 epitelial (EPG-40), efrina B2, receptor de efrina A2 (EPHa2), receptor de estrógenos, receptor Fc de

- tipo 5 (FCRL5); también conocido como receptor Fc homólogo 5 o FCRH5), receptor de acetilcolina fetal (AChR fetal), una proteína de unión a folato (FBP), receptor alfa de folato, gangliósido GD2, GD2 O-acetilado (OGD2), gangliósido GD3, glucoproteína 100 (gp100), glipicano-3 (GPC3), receptor 5D acoplado a proteína G (GPRC5D), Her2/neu (tirosina cinasa receptora erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), dímeros erbB, antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA) humano, antígeno de superficie de la hepatitis B, antígeno leucocitario humano A1 (HLA-A1), antígeno leucocitario humano A2 (HLA-A2), receptor alfa de IL-22 (IL-22R α), receptor alfa 2 de IL-13 (IL-13R α 2), receptor del dominio de inserción de cinasa (kdr), cadena ligera kappa, molécula L1 de adhesión celular (L1-CAM), epítipo CE7 de L1-CAM, miembro A de la familia 8 que contiene repeticiones ricas en leucina (LRRC8A), Lewis Y, antígeno asociado a melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, mesotelina (MSLN), c-Met, citomegalovirus (CMV) murino, mucina 1 (MUC1), MUC16, ligandos citolíticos naturales del miembro D de grupo 2 (NKG2D), melan A (MART-1), molécula de adhesión celular neural (NCAM), antígeno oncofetal, antígeno preferentemente expresado del melanoma (PRAME), receptor de progesterona, un antígeno específico de próstata, antígeno prostático de células madre (PSCA), antígeno prostático específico de membrana (PSMA), receptor 1 huérfano similar a tirosina cinasa receptora (ROR1), survivina, glucoproteína trofoblástica (TPBG también conocida como 5T4), glucoproteína 72 asociada a tumores (TAG72), proteína 1 relacionada con tirosinasa (TRP1, también conocida como TYRP1 o gp75), proteína 2 relacionada con tirosinasa (TRP2, también conocida como dopacromo tautomerasa, dopacromo delta-isomerasa o DCT), receptor del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR), receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular ((VEGFR2), Tumor de Wilms 1 (WT-1), un antígeno específico de patógeno o expresado por patógeno, o un antígeno asociado con una etiqueta universal, y/o moléculas biotiniladas, y/o moléculas expresadas por el VIH, VHC, VHB u otros patógenos. Los antígenos a los que se dirigen los receptores incluyen, en algunos casos, antígenos asociados a una neoplasia maligna de linfocitos B, tal como cualquiera de una serie de marcadores de linfocitos B conocidos. En algunos casos divulgados en el presente documento, el antígeno es o incluye CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Igkappa, Iglambda, CD79a, CD79b o CD30.
- En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión comprende una porción de un antígeno polipeptídico que es reconocido o está unido por un receptor recombinante y/o un CAR. En casos particulares divulgados en el presente documento, la molécula de unión comprende un epítipo que es reconocido o está unido por un receptor recombinante y/o un CAR. En determinados casos divulgados en el presente documento, la porción del antígeno polipeptídico contiene, aproximadamente, o contiene al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 400 o 500 aminoácidos, en algunos casos aminoácidos contiguos, del polipéptido que es reconocido o está unido por un receptor recombinante y/o un CAR. En determinados casos divulgados en el presente documento, la porción polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos del epítipo que es reconocida por el receptor recombinante y/o CAR.
- En determinados casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión es una variante polipeptídica que contiene, contiene aproximadamente, o contiene al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o un 99,5 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un polipéptido que está unido y/o es reconocido por el receptor recombinante y/o CAR.
- En determinados casos divulgados en el presente documento, una partícula está unida a una molécula de unión que comprende una porción del antígeno polipeptídico, en donde la porción es una porción de un antígeno que está unido y/o es reconocido por, o puede potencialmente estar unido o ser reconocido por un receptor recombinante, es decir, un CAR. En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión comprende una porción del antígeno que contiene el epítipo que es reconocido por el receptor recombinante. En determinados casos divulgados en el presente documento, la porción del antígeno es una porción de En algunos casos divulgados en el presente documento, el antígeno es o incluye la integrina $\alpha v \beta 6$ (integrina $\alpha v \beta 6$), antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA), B7-H3, B7-H6, anhidrasa carbónica 9 (CA9, también conocida como CAIX o G250), un antígeno del cáncer de testículo, antígeno 1B de cáncer/testículo (CTAG, también conocido como NY-ESO-1 y LAGE-2), antígeno carcinoembrionario (CEA), una ciclina, ciclina A2, ligando 1 de quimiocinas con motivo C-C (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, condroitín sulfato proteoglicano 4 (CSPG4), proteína del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), mutación del receptor del factor de crecimiento epidérmico de tipo III (EGFR VIII), glucoproteína 2 epitelial (EPG-2), glucoproteína 40 epitelial (EPG-40), efrina B2, receptor de efrina A2 (EPHA2), receptor de estrógenos, receptor Fc de tipo 5 (FCRL5); también conocido como receptor Fc homólogo 5 o FCRH5), receptor de acetilcolina fetal (AChR fetal), una proteína de unión a folato (FBP), receptor alfa de folato, gangliósido GD2, GD2 O-acetilado (OGD2), gangliósido GD3, glucoproteína 100 (gp100), glipicano-3 (GPC3), receptor 5D acoplado a proteína G (GPRC5D), Her2/neu (tirosina cinasa receptora erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), dímeros erbB, antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA) humano, antígeno de superficie de la hepatitis B, antígeno leucocitario humano A1 (HLA-A1), antígeno leucocitario humano A2 (HLA-A2), receptor alfa de IL-22 (IL-22R α), receptor alfa 2 de IL-13 (IL-13R α 2), receptor del dominio de inserción de cinasa (kdr), cadena ligera kappa, molécula L1 de adhesión celular (L1-CAM), epítipo CE7 de L1-CAM, miembro A de la familia 8 que contiene repeticiones ricas en leucina (LRRC8A), Lewis Y, antígeno asociado a melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, mesotelina (MSLN), c-Met, citomegalovirus (CMV) murino, mucina 1 (MUC1), MUC16, ligandos citolíticos naturales del miembro D de grupo 2 (NKG2D), melan A (MART-1), molécula de adhesión celular neural (NCAM), antígeno oncofetal, antígeno preferentemente expresado del melanoma (PRAME), receptor de progesterona, un antígeno específico de próstata, antígeno prostático de células madre (PSCA), antígeno prostático específico de membrana (PSMA), receptor 1 huérfano similar a tirosina cinasa receptora (ROR1),

survivina, glucoproteína trofoblástica (TPBG también conocida como 5T4), glucoproteína 72 asociada a tumores (TAG72), proteína 1 relacionada con tirosinasa (TRP1, también conocida como TYRP1 o gp75), proteína 2 relacionada con tirosinasa (TRP2, también conocida como dopacromo tautomerasa, dopacromo delta-isomerasa o DCT), receptor del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR), receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular ((VEGFR2), Tumor de Wilms 1 (WT-1), un antígeno específico de patógeno o expresado por patógeno, o un antígeno asociado con una etiqueta universal, y/o moléculas biotiniladas, y/o moléculas expresadas por el VIH, VHC, VHB u otros patógenos. Los antígenos a los que se dirigen los receptores incluyen, en algunos casos, antígenos asociados a una neoplasia maligna de linfocitos B, tal como cualquiera de una serie de marcadores de linfocitos B conocidos. En algunos casos divulgados en el presente documento, el antígeno es o incluye CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Igkappa, Iglambda, CD79a, CD79b o CD30.

En determinados casos divulgados en el presente documento, la partícula está unida a una molécula de unión que comprende una porción de un polipéptido BCMA. En algunos casos divulgados en el presente documento, la partícula está unida a una molécula de unión que comprende una porción de un polipéptido CD22. En determinados casos divulgados en el presente documento, la partícula está unida a una molécula de unión que comprende una porción de un polipéptido ROR1.

En determinados casos divulgados en el presente documento, la porción del antígeno polipeptídico es una porción de un polipéptido BCMA. En determinados casos divulgados en el presente documento, el antígeno polipeptídico contiene, contiene aproximadamente, o contiene al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o un 99,5 % de identidad de secuencia de aminoácidos con al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 50, al menos 55, al menos 60, al menos 65, al menos 70, al menos 75, al menos 80, al menos 85, al menos 90, al menos 95, al menos 100, al menos 110, al menos 120, al menos 130, al menos 140, al menos 150, al menos 160, al menos 170 o al menos 180 aminoácidos contiguos de un polipéptido BCMA. En casos particulares divulgados en el presente documento, la variante polipeptídica BCMA comprende una secuencia de aminoácidos que es, es aproximadamente, o es al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o un 98 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de un epítipo BCMA que está unido y/o es reconocido por un receptor recombinante y/o un CAR.

En casos particulares divulgados en el presente documento, el antígeno es BCMA, o una porción o variante del mismo. En algunos casos divulgados en el presente documento, el polipéptido BCMA es un polipéptido BCMA de mamífero. En casos particulares divulgados en el presente documento, el polipéptido BCMA es un polipéptido BCMA humano. En algunos casos divulgados en el presente documento, el antígeno BCMA es o comprende un dominio extracelular de BCMA o una porción del mismo que comprende un epítipo reconocido por un receptor de antígeno, por ejemplo, CAR. En determinados casos divulgados en el presente documento, el antígeno BCMA es o comprende un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 o un fragmento de la misma que contiene al menos 50, al menos 55, al menos 60, al menos 65, al menos 70, al menos 75, al menos 80, al menos 85, al menos 90, al menos 95, al menos 100, al menos 110, al menos 120, al menos 130, al menos 140, al menos 150, al menos 160, al menos 170 o al menos 180 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 1. En algunos casos divulgados en el presente documento, el antígeno BCMA es o incluye la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:1 o una porción de la misma que es o contiene un epítipo reconocido por un receptor de antígeno, por ejemplo, CAR.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el antígeno es ROR1, o una porción o variante del mismo. En determinados casos divulgados en el presente documento, el polipéptido ROR1 es de mamífero. En casos particulares divulgados en el presente documento, el polipéptido ROR1 es humano. En algunos casos divulgados en el presente documento, el antígeno ROR1 es o comprende un dominio extracelular de ROR1 o una porción del mismo que comprende un epítipo reconocido por un receptor de antígeno, por ejemplo, CAR. En algunos casos divulgados en el presente documento, el antígeno ROR1 es un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 31 o un fragmento de la misma que contiene al menos 50, al menos 55, al menos 60, al menos 65, al menos 70, al menos 75, al menos 80, al menos 85, al menos 90, al menos 95, al menos 100, al menos 110, al menos 120, al menos 130, al menos 140, al menos 150, al menos 160, al menos 170 o al menos 180 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 31. En algunos casos divulgados en el presente documento, el antígeno ROR comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:31 o una porción de la misma que comprende un epítipo reconocido por un receptor de antígeno, por ejemplo, CAR.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el antígeno es CD22, o una porción o variante del mismo. En determinados casos divulgados en el presente documento, el polipéptido CD22 es de mamífero. En casos particulares divulgados en el presente documento, el polipéptido CD22 es humano. En algunos casos divulgados en el presente documento, el antígeno es un dominio extracelular de CD22 o una porción del mismo que comprende un epítipo reconocido por un receptor de antígeno, por ejemplo, CAR. En algunos casos divulgados en el presente documento, el antígeno es un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 29 o un fragmento de la misma que contiene al menos 50, al menos 55, al menos 60, al menos 65,

al menos 70, al menos 75, al menos 80, al menos 85, al menos 90, al menos 95, al menos 100, al menos 110, al menos 120, al menos 130, al menos 140, al menos 150, al menos 160, al menos 170 o al menos 180 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 29. En algunos casos divulgados en el presente documento, el antígeno CD22 comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:29 o una porción de la misma que comprende un epítipo reconocido por un receptor de antígeno, por ejemplo, CAR.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la porción del antígeno polipeptídico es una porción de un polipéptido BCMA. En determinados casos divulgados en el presente documento, la porción del antígeno polipeptídico es una porción de un polipéptido CD22. En casos particulares divulgados en el presente documento, la porción del antígeno polipeptídico es una porción de un polipéptido ROR1. En determinados casos divulgados en el presente documento, la porción del polipéptido contiene al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 50, al menos 55, al menos 60, al menos 65, al menos 70, al menos 75, al menos 80, al menos 85, al menos 90, al menos 95, al menos 100, al menos 110, al menos 120, al menos 130, al menos 140, al menos 150, al menos 160, al menos 170 o al menos 180 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 1, 29 o 31.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la célula expresa un CAR que se une a o reconoce una etiqueta universal que se puede fusionar con un anticuerpo o un fragmento o variante del mismo. En casos particulares divulgados en el presente documento, las células que expresan dichos CAR pueden reconocer y destruir específicamente células diana, por ejemplo, células tumorales, que se han unido mediante anticuerpos que se han fusionado con la etiqueta universal. Un ejemplo incluye, pero sin limitación, linfocitos T que expresan CAR anti FITC que pueden unirse a y/o reconocer diversas células neoplásicas humanas cuando estas células están unidas por anticuerpos marcados con FITC reactivos al cáncer. Por lo tanto, en algunos casos divulgados en el presente documento, el mismo CAR que se une a la etiqueta universal es útil para el tratamiento de diferentes cánceres, siempre que haya anticuerpos disponibles que reconozcan antígenos asociados con los cánceres que contienen la etiqueta universal. En casos particulares divulgados en el presente documento, una partícula (por ejemplo, una partícula de perla) comprende una molécula de unión expuesta en la superficie que comprende un antígeno, o una porción del mismo, que se une o es reconocido por un receptor de antígeno, por ejemplo, CAR, que se une a una etiqueta universal. En determinados casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión es una etiqueta universal o una porción de la misma unida o reconocida por el receptor de antígeno, por ejemplo, CAR.

Los casos particulares divulgados en el presente documento contemplan que cualquier dominio polipeptídico que se pueda fusionar a un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno o variante del mismo, que no impida que el anticuerpo se una a su diana respectiva, es adecuado para su uso como una etiqueta universal. En algunos casos divulgados en el presente documento, una partícula está unida a una molécula de unión que comprende una etiqueta universal, o una porción de la misma, seleccionada del grupo que consiste en: FITC, estreptavidina, biotina, histidina, dinitrofenol, complejo proteico de peridina clorofila, proteína verde fluorescente, PE, HRP, palmitoilación, nitrosilación, fosfatasa de alcalina, glucosa oxidasa y proteína de unión a maltosa.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión es un multímero, por ejemplo, un dímero, que comprende dos o más antígenos polipeptídicos, o una porción o variante de los mismos, que es reconocido y/o está unido por un receptor recombinante, tal como un receptor de antígeno (por ejemplo, un CAR). En algunos casos divulgados en el presente documento, el antígeno polipeptídico, o una porción del mismo, son idénticos. En determinados casos divulgados en el presente documento, el antígeno polipeptídico está unido, directa o indirectamente, a una región o dominio, por ejemplo, un dominio de multimerización, que promueve o estabiliza la interacción entre dos o más antígenos polipeptídicos a través de interacciones complementarias entre los dominios o regiones. En algunos casos divulgados en el presente documento, proporcionar el antígeno polipeptídico como un multímero, por ejemplo, un dímero, proporciona una interacción multivalente entre la molécula de unión y el dominio de unión a antígeno del receptor de antígeno, por ejemplo, CAR, que, en algunos casos divulgados en el presente documento, puede aumentar la avididad de la interacción. En algunos casos divulgados en el presente documento, una mayor avididad puede favorecer la actividad estimuladora o agonista del receptor de antígeno, por ejemplo, CAR, por la molécula de unión conjugada con la perla.

En algunos casos divulgados en el presente documento, un polipéptido se une directa o indirectamente a un dominio de multimerización. Los dominios de multimerización de ejemplo incluyen las secuencias de inmunoglobulina o porciones de las mismas, cremalleras de leucina, regiones hidrófobas, regiones hidrófilas y dominios de interacción proteína-proteína compatibles. El dominio de multimerización, por ejemplo, puede ser una región o dominio constante de inmunoglobulina, tal como, por ejemplo, el dominio Fc o porciones del mismo de IgG, incluyendo los subtipos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, IgA, IgE, IgD e IgM y formas modificadas de las mismas. En casos particulares divulgados en el presente documento, el antígeno polipeptídico está unido, directa o indirectamente, a un dominio Fc. En algunos casos divulgados en el presente documento, el polipéptido es un polipéptido de fusión que comprende el antígeno polipeptídico o una porción del mismo y el dominio Fc.

En casos particulares divulgados en el presente documento, una molécula de unión es un polipéptido de fusión que comprende un dominio Fc. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc está compuesto por el segundo y tercer dominios constantes (es decir, dominios CH2 y CH3) de la cadena pesada de un isotipo IgG, IgA

o IgD, por ejemplo, CH2 o CH3 de los isotipos IgG, IgA e IgD. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc está compuesto por tres dominios constantes de cadena pesada (es decir, dominios CH2, CH3 y CH4) de un isotipo IgM o IgE. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc puede incluir además una secuencia bisagra o una porción de la misma. En determinados casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc contiene parte o la totalidad de un dominio bisagra de una molécula de inmunoglobulina más un dominio CH2 y un dominio CH3. En algunos casos, el dominio Fc puede formar un dímero de dos cadenas polipeptídicas unidas por uno o más enlaces disulfuro. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc procede de una inmunoglobulina (por ejemplo, IgG, IgA, IgM o IgE) de un mamífero adecuado (por ejemplo, ser humano, ratón, rata, cabra, oveja o mono). En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc comprende los dominios C_H2 y C_H3 de IgG. En determinados casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc está fusionado al extremo C del antígeno polipeptídico. En casos particulares divulgados en el presente documento, el dominio Fc está fusionado al extremo N del antígeno polipeptídico.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG, o una porción o variante del mismo. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG humana, o una porción o una variante del mismo, que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2. En casos particulares divulgados en el presente documento, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG humana de tipo natural, o una porción o variante del mismo. En casos particulares divulgados en el presente documento, el dominio Fc es una variante del dominio Fc de IgG1 humana de tipo natural.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el polipéptido de fusión comprende un dominio Fc variante. En determinados casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc de IgG humana variante contiene una mutación, por ejemplo, una sustitución, delección o inserción, que reduce, desciende y/o disminuye el emparejamiento entre el dominio Fc y una cadena ligera. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc de IgG humana variante contiene una mutación que reduce la afinidad de unión entre el dominio Fc y un receptor Fc. En casos particulares divulgados en el presente documento, el dominio Fc de IgG humana variante contiene una mutación que reduce, desciende y/o disminuye las interacciones, o la probabilidad o posibilidad de una interacción, entre el dominio Fc y un receptor Fc. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc de IgG humana variante contiene una mutación que reduce la afinidad de unión entre el dominio Fc y una proteína del sistema del complemento. En casos particulares divulgados en el presente documento, el dominio Fc de IgG humana variante contiene una mutación que reduce, desciende y/o disminuye las interacciones, o la probabilidad o posibilidad de una interacción, entre el dominio Fc y una proteína del sistema del complemento.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión comprende un dominio Fc de IgG1 humana variante. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc de IgG humana variante contiene una sustitución de cistina por serina en la región bisagra del dominio Fc. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc de IgG humana variante contiene una sustitución de leucina por alanina en la región bisagra del dominio Fc. En casos particulares divulgados en el presente documento, el dominio Fc de IgG humana variante contiene una sustitución de glicina por alanina en la región bisagra. En determinados casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc de IgG humana variante contiene una sustitución de alanina por serina en la región CH2 del dominio Fc. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc de IgG humana variante comprende una sustitución de prolina por serina en la región CH2 del dominio Fc. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc de IgG humana variante comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 28.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión comprende un polipéptido de fusión que comprende un dominio Fc, en donde el dominio Fc está presente en el extremo C del polipéptido de fusión.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión es un polipéptido de fusión que comprende un polipéptido BCMA, o una porción del mismo, y un dominio Fc. En algunos casos divulgados en el presente documento, el polipéptido BCMA o una porción del mismo comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % con respecto a la SEQ ID NO: 1 y contiene un epítipo reconocido por el receptor de antígeno, por ejemplo, el CAR. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2 o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 28 o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % con respecto a la SEQ ID NO: 28. En algunos casos divulgados en el presente documento, el antígeno BCMA incluye BCMA, o una porción o variante del mismo, y una etiqueta o un dominio de fusión, por ejemplo, un dominio Fc. En casos particulares divulgados en el presente documento, el antígeno BCMA contiene toda o una porción de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 35 o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % con respecto a la SEQ ID NO: 35.

90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % con respecto a la SEQ ID NO: 35, y que comprende un epítipo reconocido por un receptor de antígeno, por ejemplo, CAR.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión es un polipéptido de fusión que comprende un polipéptido ROR1 o una porción del mismo, y un dominio Fc. En algunos casos divulgados en el presente documento, el polipéptido ROR1 o una porción del mismo comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 31 o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % con respecto a la SEQ ID NO: 31 y que comprende un epítipo reconocido por el receptor de antígeno, por ejemplo, CAR, y un dominio Fc. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2 o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:2. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 28 o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % con respecto a la SEQ ID NO:28. En determinados casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión es un polipéptido de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 33 o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % con respecto a la SEQ ID NO:33, y que comprende un epítipo reconocido por un receptor de antígeno, por ejemplo, CAR.

En casos particulares divulgados en el presente documento, la molécula de unión es un polipéptido de fusión que comprende un polipéptido CD22 expuesto en la SEQ ID NO:29 o una porción del mismo o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % con respecto a la SEQ ID NO: 29 y que comprende un epítipo reconocido por el receptor de antígeno, por ejemplo, CAR, y un dominio Fc. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2 o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:2. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 28 o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % con respecto a la SEQ ID NO:28. En determinados casos divulgados en el presente documento, el polipéptido de fusión comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 34 o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % con respecto a la SEQ ID NO:34, y que comprende un epítipo reconocido por un receptor de antígeno, por ejemplo, CAR.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el antígeno y el dominio de multimerización, tal como el dominio Fc, están conectados por un enlazador, tal como un enlazador de aminoácidos. En determinados casos divulgados en el presente documento, el antígeno se fusiona al extremo N de un enlazador de aminoácidos, y el dominio de multimerización, tal como el dominio Fc, se fusiona al extremo C del enlazador. Aunque los enlazadores de aminoácidos pueden tener cualquier longitud y contener cualquier combinación de aminoácidos, la longitud del enlazador puede ser relativamente corta (por ejemplo, diez o menos aminoácidos) para reducir las interacciones entre los dominios enlazados. La composición de aminoácidos del enlazador también puede ajustarse para reducir el número de aminoácidos con cadenas laterales voluminosas o aminoácidos que puedan introducir una estructura secundaria. Los enlazadores de aminoácidos adecuados incluyen, pero sin limitación, aquellos de hasta 3, 4, 5, 6, 7, 10, 15, 20 o 25 aminoácidos de longitud. Las secuencias enlazadoras de aminoácidos representativas incluyen GGGGS (SEQ ID NO: 27), y enlazadores que comprenden 2, 3, 4 o 5 copias de GGGGS (SEQ ID NO: 27).

En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión es un dímero formado por dos polipéptidos de fusión Fc que contienen un antígeno polipeptídico o una porción del mismo un dominio Fc, por ejemplo, BCMA-Fc, ROR1-Fc o CD22-Fc. También se divulgan moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de los polipéptidos de fusión Fc. También se divulgan vectores, incluyendo vectores de expresión, que codifican las moléculas de ácido nucleico. En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión se puede producir en células mediante expresión en una célula hospedadora adecuada. En algunos casos divulgados en el presente documento, la célula hospedadora es una estirpe celular de mamífero. Los ejemplos de células de mamífero para la expresión recombinante de proteínas incluyen células HEK293 o células CHO o derivados de las mismas. En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión incluye además un péptido señal para la secreción de la célula. En un caso de ejemplo divulgado en el presente documento, el péptido señal es CD33 (por ejemplo, expuesto en la SEQ ID NO: 30). En algunos casos divulgados en el presente documento, la proteína de fusión antígeno polipeptídico-Fc resultante, por ejemplo, BCMA-Fc, ROR1-Fc o CD22-Fc, se puede expresar en células hospedadoras, por ejemplo, transformada con los vectores de expresión, por lo que el ensamblaje entre dominios Fc puede producirse mediante enlaces disulfuro intercatenarios formados entre los restos Fc para producir una proteína de fusión de antígeno polipeptídico dimérica, tal como divalente.

En casos particulares divulgados en el presente documento, la molécula de unión es o contiene BCMA humano o una

porción del mismo. En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión comprende el dominio extracelular de BCMA humano. En casos particulares divulgados en el presente documento, la molécula de unión comprende una porción de BCMA humano con una secuencia de polipéptidos expuesta en la SEQ ID NO: 1. En casos particulares divulgados en el presente documento, la molécula de unión es un polipéptido de fusión que comprende un dominio extracelular de BCMA humano y un dominio Fc. En determinados casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc es una variante de un dominio Fc de IgG1 humana. En determinados casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc está ubicado en el extremo C del polipéptido de fusión. En casos particulares divulgados en el presente documento, el polipéptido de fusión comprende una porción de BCMA humano que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1 y un dominio Fc de IgG1 humana variante que comprende un aminoácido expuesto en la SEQ ID NO: 29. En algunos casos divulgados en el presente documento, el polipéptido de fusión comprende un enlazador que une el polipéptido BCMA al dominio Fc. En casos particulares divulgados en el presente documento, el enlazador tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 27. En determinados casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión es un polipéptido de fusión que comprende un polipéptido BCMA humano (o una porción o una variante del mismo) y un dominio Fc en el extremo C y se conjuga en la superficie o se une de otro modo a una partícula (por ejemplo, partícula de perla). En casos particulares divulgados en el presente documento, el polipéptido de fusión está unido a la partícula en un sitio dentro del dominio Fc. En algunos casos divulgados en el presente documento, la partícula comprende además un anticuerpo conjugado en la superficie o un fragmento o variante del mismo, que se une a CD28 o lo reconoce.

2. Anticuerpos antiidiotipo

En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión conjugada con una partícula, por ejemplo, perla, como se divulga en el presente documento es un anticuerpo antiidiotipo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, ("anti ID") que se une a un receptor de antígeno diana, por ejemplo, CAR, o un fragmento activo del mismo. En determinados casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión es un anti ID que se une al dominio de unión a antígeno del CAR. En casos particulares divulgados en el presente documento, el dominio de unión a antígeno del CAR comprende un dominio scFv. En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión es un anti ID que se une a un CAR en el dominio de unión a antígeno, y no se une a la región enlazadora o espaciadora del CAR que conecta el dominio de unión a antígeno, por ejemplo, un scFv, con un dominio transmembrana del CAR.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el anti ID es un anticuerpo antiidiotipo o fragmentos de unión a antígeno que reconoce específicamente un anticuerpo que se une a un antígeno diana, tal como un antígeno diana asociado con o expresado en una célula o tejido de una enfermedad o afección, por ejemplo, cáncer. En algunos casos divulgados en el presente documento, el anti ID es un anticuerpo antiidiotipo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que reconoce específicamente un anticuerpo diana que se une al antígeno que es o incluye. En algunos casos divulgados en el presente documento, el antígeno es o incluye la integrina $\alpha\beta6$ (integrina avb6), antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA), B7-H3, B7-H6, anhidrasa carbónica 9 (CA9, también conocida como CAIX o G250), un antígeno del cáncer de testículo, antígeno 1B de cáncer/testículo (CTAG, también conocido como NY-ESO-1 y LAGE-2), antígeno carcinoembrionario (CEA), una ciclina, ciclina A2, ligando 1 de quimiocinas con motivo C-C (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, condroitín sulfato proteoglucano 4 (CSPG4), proteína del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), mutación del receptor del factor de crecimiento epidérmico de tipo III (EGFR III), glucoproteína 2 epitelial (EPG-2), glucoproteína 40 epitelial (EPG-40), efrina B2, receptor de efrina A2 (EPHa2), receptor de estrógenos, receptor Fc de tipo 5 (FCRL5); también conocido como receptor Fc homólogo 5 o FCRH5), receptor de acetilcolina fetal (AChR fetal), una proteína de unión a folato (FBP), receptor alfa de folato, gangliósido GD2, GD2 O-acetilado (OGD2), gangliósido GD3, glucoproteína 100 (gp100), glipicano-3 (GPC3), receptor 5D acoplado a proteína G (GPRC5D), Her2/neu (tirosina cinasa receptora erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), dímeros erbB, antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA) humano, antígeno de superficie de la hepatitis B, antígeno leucocitario humano A1 (HLA-A1), antígeno leucocitario humano A2 (HLA-A2), receptor alfa de IL-22 (IL-22R α), receptor alfa 2 de IL-13 (IL-13R α 2), receptor del dominio de inserción de cinasa (kdr), cadena ligera kappa, molécula L1 de adhesión celular (L1-CAM), epítipo CE7 de L1-CAM, miembro A de la familia 8 que contiene repeticiones ricas en leucina (LRRC8A), Lewis Y, antígeno asociado a melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, mesotelina (MSLN), c-Met, citomegalovirus (CMV) murino, mucina 1 (MUC1), MUC16, ligandos citolíticos naturales del miembro D de grupo 2 (NKG2D), melan A (MART-1), molécula de adhesión celular neural (NCAM), antígeno oncofetal, antígeno preferentemente expresado del melanoma (PRAME), receptor de progesterona, un antígeno específico de próstata, antígeno prostático de células madre (PSCA), antígeno prostático específico de membrana (PSMA), receptor 1 huérano similar a tirosina cinasa receptora (ROR1), survivina, glucoproteína trofoblástica (TPBG también conocida como 5T4), glucoproteína 72 asociada a tumores (TAG72), proteína 1 relacionada con tirosinasa (TRP1, también conocida como TYRP1 o gp75), proteína 2 relacionada con tirosinasa (TRP2, también conocida como dopacromo tautomerasa, dopacromo delta-isomerasa o DCT), receptor del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR), receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular ((VEGFR2), Tumor de Wilms 1 (WT-1), un antígeno específico de patógeno o expresado por patógeno, o un antígeno asociado con una etiqueta universal, y/o moléculas biotiniladas, y/o moléculas expresadas por el VIH, VHC, VHB u otros patógenos. Los antígenos a los que se dirigen los receptores incluyen, en algunos casos, antígenos asociados a una neoplasia maligna de linfocitos B, tal como cualquiera de una serie de marcadores de linfocitos B conocidos. En algunos casos divulgados en el presente documento, el antígeno

es o incluye CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Igkappa, Iglambda, CD79a, CD79b o CD30.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el anti ID es un anticuerpo antiidiotipo o fragmentos de unión a antígeno que reconoce específicamente un anticuerpo diana que se une a ROR1, antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA), anhidrasa carbónica 9 (CA-CAIX), Her2/neu (tirosina cinasa receptora erbB2), LI-CAM, CD19, CD20, CD22, mesotelina, CEA y el antígeno de superficie de la hepatitis B, receptor anti folato, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, glucoproteína 2 epitelial (EPG-2), glucoproteína 40 epitelial (EPG-40), EPHA2, erb-B2, erb-B3, erb-B4, dímeros erbB, EGFR VIII, proteína de unión a folato (FBP), FCRL5, FCRH5, receptor de acetilcolina fetal, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-alfa, IL-13R-alfa2, receptor del dominio de inserción de cinasa (kdr), cadena ligera kappa, Lewis Y, molécula L1 de adhesión celular, (L1-CAM), antígeno asociado a melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, antígeno preferentemente expresado del melanoma (PRAME), survivina, TAG72, B7-H6, receptor IL-13 alfa 2 (IL-13Ra2), CA9, GD3, HMW-MAA, CD171, G250/CAIX, HLA-AI MAGE AI, HLA-A2 NY-ESO-1, PSCA, receptor alfa de folato, CD44v6, CD44v7/8, integrina avb6, 8H9, NCAM, receptores de VEGF, 5T4, AchR fetal, ligandos de 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), antígeno específico de próstata, PSMA, Her2/neu, receptor de estrógenos, receptor de progesterona, efrina B2, CD123, c-Met, GD-2, GD2 O-acetilado (OGD2), CE7, tumor de Wilms 1 (WT-1), una ciclina, ciclina A2, CCL-1, CD138 o un antígeno específico de patógeno.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el anti ID es un anticuerpo antiidiotipo o fragmentos de unión a antígeno ("anti ID") que reconoce específicamente un resto de anticuerpo anti CD19 diana. En algunos casos divulgados en el presente documento, los anticuerpos divulgados reconocen un anticuerpo anti CD19 diana que es SJ25C1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo o es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno procedente de SJ25C1. En algunos casos divulgados en el presente documento, los anticuerpos divulgados reconocen un anticuerpo anti CD19 diana que es FMC63 o un fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno procedente de FMC63.

SJ25C1 es un anticuerpo de IgG1 monoclonal de ratón generado contra células Nalm-1 y -16 que expresan CD19 de origen humano (Ling, N. R., *et al.* (1987). Leucocyte typing III. 302). El anticuerpo SJ25C1 comprende las CDRH1, H2 y H3 expuestas en las SEQ ID NO: 40-42, respectivamente, y las secuencias de CDRL1, L2 y L3 expuestas en las SEQ ID NO: 43-45, respectivamente. El anticuerpo SJ25C1 comprende la región variable de cadena pesada (V_H) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 y la región variable de cadena ligera (V_L) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo diana es SJ25C1 o un anticuerpo procedente de SJ25C1. En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo procedente de SJ25C1 es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende V_H y/o V_L de SJ25C1, el idiotipo de SJ25C1, el paratopo de SJ25C1, o una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de SJ25C1. En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo diana que es SJ25C1 o un anticuerpo procedente de SJ25C1 es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende la V_H de SJ25C1 expuesta en la SEQ ID NO: 36, o una variante del mismo que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia expuesta en la SEQ ID NO:36, y/o la V_L de SJ25C1 expuesta en la SEQ ID NO:37, o una variante del mismo que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:37. En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende la V_H de SJ25C1 expuesta en la SEQ ID NO:36, o una variante del mismo que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:36, y la V_L de SJ25C1 expuesta en la SEQ ID NO:37, o una variante del mismo que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:37. En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende la V_H y V_L de SJ25C1 expuesta en la SEQ ID NO:36 y la SEQ ID NO:37, respectivamente. En algunos casos divulgados en el presente documento, la variante tiene al menos un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:36 y/o la SEQ ID NO:37.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo diana que es SJ25C1 o un anticuerpo procedente de SJ25C1 es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende una o más CDR de cadena pesada (CDR-H) de V_H de SJ25C1 expuesta en la SEQ ID NO:36, tal como se expone en las SEQ ID NO: 40-42 y/o una o más CDR de cadena ligera (CDR-L) de la V_L de SJ25C1 expuesta en la SEQ ID NO:37, tal como se expone en las SEQ ID NO: 43-45. En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende CDR-H3 de SJ25C1 (por ejemplo, expuesta en la SEQ ID NO: 42) y/o CDR-L3 de SJ25C1 (por ejemplo, expuesta en la SEQ ID NO: 45). En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende CDR-H3 y CDR-L3 de SJ25C1 (por ejemplo, expuestas en la SEQ ID NO:42 y SEQ ID NO:43, respectivamente). En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una o más de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de SJ25C1 (por ejemplo, expuestas en las SEQ ID NO: 40, 41, 42, respectivamente) y/o una o más de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de SJ25C1 (por ejemplo, expuestas en las SEQ ID NO: 43, 44, 45, respectivamente). En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de SJ25C1 (por ejemplo, expuestas en las SEQ ID NO: 40, 41, 42, respectivamente) y/o CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de SJ25C1 (por ejemplo, expuestas en las SEQ ID NO: 43, 44, 45, respectivamente). En algunos casos divulgados en el

presente documento, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de SJ25C1 (por ejemplo, expuestas en las SEQ ID NO: 40, 41, 42, respectivamente) y CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de SJ25C1 (por ejemplo, expuestas en las SEQ ID NO: 43, 44, 45, respectivamente). En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende un fragmento de unión a antígeno, tal como un fragmento de unión a antígeno (Fab), un F(ab')₂, un Fab', una variable de fragmento (Fv) o un Fv monocatenario (scFv). Véase, por ejemplo, Bejcek, B. E., *et al.* (1995). *Cancer research*. 55(11): 2346-2351.

FMC63 es un anticuerpo IgG1 monoclonal de ratón generado contra células JVM3 que expresan CD19 de origen humano (Nicholson., *et al.* (1997). *Molecular Immunology*. 34(16-17):1157-1165). El anticuerpo FMC63 comprende las CDRH1, H2 y H3 expuestas en las SEQ ID NO: 46-48, respectivamente, y las secuencias de CDRL1, L2 y L3 expuestas en las SEQ ID NO: 49-51, respectivamente. El anticuerpo FMC63 comprende la región variable de cadena pesada (V_H) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38 y la región variable de cadena ligera (V_L) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo diana es FMC63 o un anticuerpo procedente de FMC63. En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo procedente de FMC63, es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende V_H y/o V_L de FMC63, el idiotipo de FMC63, el parátipo de FMC63, o una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de FMC63. En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo diana que es FMC63 o un anticuerpo procedente de FMC63 es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende V_H de FMC63 expuesta en la SEQ ID NO:38, o una variante del mismo que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:38, y/o la V_L de FMC63 expuesta en la SEQ ID NO:39, o una variante del mismo que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:39. En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende la V_H de FMC63 expuesta en la SEQ ID NO:38, o una variante del mismo que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:38, y la V_L de FMC63 expuesta en la SEQ ID NO:39, o una variante del mismo que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:39. En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende la V_H y V_L de FMC63 expuestas en la SEQ ID NO:38 y 39, respectivamente. En algunos casos divulgados en el presente documento, la variante tiene al menos un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:38 y/o la SEQ ID NO:39.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo diana que es FMC63 o un anticuerpo procedente de FMC63 es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende una o más CDR de cadena pesada (CDR-H) de V_H de FMC63 expuesta en la SEQ ID NO:38, tal como se expone en las SEQ ID NO: 46-48 y/o una o más CDR de cadena ligera (CDR-L) de la V_L de FMC63 expuesta en la SEQ ID NO:39, tal como se expone en las SEQ ID NO: 49-51. En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo diana que es FMC63 o un anticuerpo procedente de FMC63 es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende CDR-H3 de FMC63 (por ejemplo, expuesta en la SEQ ID NO: 48) y/o CDR-L3 de FMC63 (por ejemplo, expuesta en la SEQ ID NO: 51). En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende CDR-H3 (por ejemplo, expuesta en la SEQ ID NO: 48) y CDR-L3 de FMC63 (por ejemplo, expuesta en la SEQ ID NO: 51). En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo diana que es FMC63 o un anticuerpo procedente de FMC63 es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende una o más de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de FMC63 (por ejemplo, expuestas en las SEQ ID NO: 46, 47, 48, respectivamente) y/o una o más de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de FMC63 (por ejemplo, expuestas en las SEQ ID NO: 49, 50, 51, respectivamente). En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo diana que es FMC63 o un anticuerpo procedente de FMC63 es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de FMC63 (por ejemplo, expuestas en las SEQ ID NO: 46, 47, 48, respectivamente) y/o CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de FMC63 (por ejemplo, expuestas en las SEQ ID NO: 49, 50, 51, respectivamente). En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende un fragmento de unión a antígeno, tal como un fragmento de unión a antígeno (Fab), un F(ab')₂, un Fab', una variable de fragmento (Fv) o un Fv monocatenario (scFv).

En algunos casos divulgados en el presente documento, los anticuerpos antiidiotipo divulgados incluyen anticuerpos que se unen específicamente a un dominio variable (Fv), tal como un Fv monocatenario (scFv), procedente de SJ25C1 o FMC63. En algunos casos divulgados en el presente documento, los anticuerpos antiidiotipo se unen específicamente a un epítipo o región particular de un Fv, generalmente un epítipo o región que comprende una o más regiones determinantes de complementariedad. En algunos casos divulgados en el presente documento, los anticuerpos antiidiotipo se unen específicamente a un epítipo o región superpuesta a un parátipo Fv.

En algunos casos divulgados en el presente documento, los anticuerpos antiidiotipo divulgados incluyen los que se unen específicamente a un resto anti CD19 procedente de SJ25C1 o FMC63 que está contenido como parte del dominio extracelular de un receptor de antígeno quimérico (CAR) diana. En algunos casos divulgados en el presente documento, el CAR diana contiene una porción de unión a antígeno que contiene la molécula de anticuerpo SJ25C1

o FMC63 o un fragmento o porción de unión a antígeno del anticuerpo SJ25C1 o FMC63. En algunos casos divulgados en el presente documento, el CAR diana incluye un dominio de unión a antígeno que es un scFv procedente de las cadenas VH y VL del anticuerpo SJ25C1 o FMC63. En algunos casos divulgados en el presente documento, se divulga un anticuerpo antiidiotipo que se une específicamente a un CAR anti CD19 que contiene un scFv procedente del anticuerpo SJ25C1 o FMC63. A continuación se describen con más detalle características de ejemplo de los CAR.

En el presente documento, el término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio e incluye anticuerpos policlonales y monoclonales, incluyendo anticuerpos inalterados y fragmentos de anticuerpos (de unión a antígeno) funcionales, incluyendo fragmentos de unión a antígeno (Fab), fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fab', fragmentos Fv, fragmentos de IgG recombinante (rIgG), fragmentos de anticuerpos monocatenarios, incluyendo fragmentos variables monocatenarios (scFv) y fragmentos de anticuerpos de dominio único (por ejemplo, sdAb, sdFv, nanocuerpo). El término abarca formas de inmunoglobulinas genomanipuladas y/o modificadas de otro modo, tales como intracuerpos, peptidocuerpos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos completamente humanos, anticuerpos humanizados y anticuerpos heteroconjugados, multispecíficos, por ejemplo, biespecíficos, anticuerpos, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos, di-scFv en tándem, tri-scFv en tándem. A menos que se indique lo contrario, debe entenderse que el término "anticuerpo" abarca fragmentos de anticuerpos funcionales del mismo. El término también abarca anticuerpos inalterados o de longitud completa, incluyendo anticuerpos de cualquier clase o subclase, incluyendo IgG y subclases de la misma, IgM, IgE, IgA e IgD.

La expresión "anticuerpo antiidiotipo" se refiere a un anticuerpo, incluyendo fragmentos de unión a antígeno del mismo, que reconoce específicamente, está dirigido específicamente a y/o se une específicamente a un idiotype de un anticuerpo, tal como un fragmento de unión a antígeno. Los idiotipos de un anticuerpo pueden incluir, pero sin limitación necesariamente, residuos dentro de una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo, regiones variables del anticuerpo y/o porciones parciales o porciones de dichas regiones variables y/o de dichas CDR, y/o cualquier combinación de los anteriores. La CDR puede ser una o más seleccionadas del grupo que consiste en CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3. Las regiones variables del anticuerpo pueden ser regiones variables de cadena pesada, regiones variables de cadena ligera o una combinación de las regiones variables de cadena pesada y las regiones variables de cadena ligera. Los fragmentos parciales o porciones de las regiones variables de cadena pesada y/o las regiones variables de cadena ligera del anticuerpo pueden ser fragmentos que incluyen 2 o más, 5 o más o 10 o más aminoácidos contiguos, por ejemplo, de o de aproximadamente 2 a 100, de 5 a 100, de 10 a 100, de 2 a 50, de 5 a 50 o de 10 a 50 aminoácidos contiguos dentro de las regiones variables de cadena pesada o las regiones variables de cadena ligera del anticuerpo; el idiotype puede incluir múltiples tramos no contiguos de aminoácidos. Los fragmentos parciales de las regiones variables de la cadena pesada y de las regiones variables de la cadena ligera del anticuerpo pueden ser fragmentos que incluyen 2 o más, 5 o más o 10 o más aminoácidos contiguos, por ejemplo, de o de 2 a 100, de 5 a 100, de 10 a 100, de 2 a 50, de 5 a 50 o de 10 a 50 aminoácidos contiguos dentro de las regiones variables, y en algunos casos divulgados en el presente documento contienen una o más CDR o fragmentos de CDR. Los fragmentos de CDR pueden ser 2 o más, o 5 o más aminoácidos consecutivos o no consecutivos dentro de la CDR. Por lo tanto, los idiotipos del anticuerpo pueden ser de o de aproximadamente 2 a 100, de 5 a 100, de 10 a 100, de 2 a 50, de 5 a 50 o de 10 a 50 aminoácidos contiguos que contienen una o más CDR o uno o más fragmentos de CDR dentro de las regiones variables de cadena pesada o las regiones variables de cadena ligera del anticuerpo. En otro caso divulgado en el presente documento, los idiotipos pueden ser un solo aminoácido que se encuentra en las regiones variables del anticuerpo, por ejemplo, sitios de CDR.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el idiotype es cualquier determinante antigénico o epítipo único dentro de la porción variable de un anticuerpo. En algunos casos, puede superponerse al sitio de unión a antígeno real del anticuerpo y, en algunos casos, puede comprender secuencias de región variable fuera del sitio de unión a antígeno del anticuerpo. El conjunto de idiotipos individuales de un anticuerpo se divulga en algunos casos en el presente documento como el "idiotipo" de dicho anticuerpo.

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

Los límites exactos de la secuencia de aminoácidos de una CDR o FR dada se pueden determinar fácilmente usando cualquiera de varios esquemas bien conocidos, incluyendo los descritos por Kabat *et al.* (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5.^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (esquema de numeración "Kabat"), Al-Lazikani *et al.*, (1997) JMB 273,927-948 (esquema de numeración "Chothia"), MacCallum *et al.*, J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996), "Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography", J. Mol. Biol. 262, 732-745". (Esquema de numeración "Contact"), Lefranc MP *et al.*, "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains", Dev Comp Immunol, enero de 2003;27(1): 55-77 (esquema de numeración "IMGT"), y Honegger A y Pluckthun A, "Yet another

numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool", J Mol Biol, junio de 2001;8:309(3): 657-70, (esquema de numeración "Aho").

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

La Tabla 1, a continuación, enumera los límites de posición de ejemplo de CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 y CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3 según lo identificado mediante los esquemas de Kabat, Chothia y Contact, respectivamente. Para la CDR-H1, la numeración de residuos se enumera usando los esquemas de numeración de Kabat y Chothia. Las FR se ubican entre las CDR, por ejemplo, con FR-L1 ubicado entre CDR-L1 y CDR-L2, y así sucesivamente. Se observa que debido a que el esquema de numeración de Kabat que se muestra coloca inserciones en H35A y H35B, el final del bucle Chothia CDR-H1 cuando se numera usando la convención de numeración de Kabat que se muestra varía entre H32 y H34, dependiendo de la longitud del bucle.

Tabla 1

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

Por lo tanto, a menos que se especifique lo contrario, una "CDR" o "región determinante complementaria", o CDR específicas individuales (por ejemplo, "CDR-H1, CDR-H2), de un anticuerpo dado o región del mismo, tal como una región variable del mismo, debe entenderse que abarca una región determinante de complementariedad (o la región determinante de complementariedad específica) definida por cualquiera de los esquemas mencionados anteriormente. Por ejemplo, cuando se indica que una CDR particular (por ejemplo, una CDR-H3) contiene la secuencia de aminoácidos de una CDR correspondiente en una secuencia de aminoácidos de V_H o V_L dada, se entiende que tal CDR tiene una secuencia de la CDR correspondiente (por ejemplo, CDR-H3) dentro de la región variable, como se define en cualquiera de los esquemas mencionados anteriormente. En algunos casos divulgados en el presente documento, se especifican secuencias de CDR específicas.

Asimismo, a menos que se especifique lo contrario, una FR o una o más FR individuales especificadas (por ejemplo, FR-H1, FR-H2), de un anticuerpo dado o región del mismo, tal como una región variable del mismo, debe entenderse que abarcan una región marco (o la específica) definida por cualquiera de los esquemas conocidos. En algunos casos divulgados en el presente documento, se especifica el esquema de identificación de una CDR, FR, o varias FR o CDR particulares, tal como la CDR definida por el método de Kabat, Chothia o Contact. En otros casos, se proporciona la secuencia de aminoácidos particular de una CDR o FR.

La expresión "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que está implicada en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera (V_H y V_L, respectivamente) de un anticuerpo natural tienen generalmente estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones marco conservadas (FR) y tres CDR. (Véase, por ejemplo, Kindt *et al.* Kuby Immunology, 6.^a ed., W. H. Freeman and Co., página 91 (2007). Un solo dominio V_H o V_L puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Además, los anticuerpos que se unen a un antígeno particular pueden aislarse usando un dominio V_H o V_L de un anticuerpo que se une al antígeno para cribar una biblioteca de dominios V_L o V_H complementarios, respectivamente. Véanse, por ejemplo, Portolano *et al.*, J. Immunol. 150: 880-887 (1993); Clarkson *et al.*, Nature 352: 624-628 (1991).

Entre los anticuerpos divulgados se encuentran fragmentos de anticuerpo. Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo inalterado que comprende una porción de un anticuerpo inalterado que se une al antígeno al que se une el anticuerpo inalterado. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario (por ejemplo, scFv); y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. En casos particulares divulgados en el presente documento, los anticuerpos son fragmentos de anticuerpos monocatenarios que comprenden una región de cadena pesada variable y/o una región de cadena ligera variable, tal como scFv.

Los anticuerpos de un solo dominio son fragmentos de anticuerpo que comprenden la totalidad o una porción del dominio variable de cadena pesada o la totalidad o una porción del dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo. En determinados casos divulgados en el presente documento, un anticuerpo de un solo dominio es un anticuerpo humano de un solo dominio.

Los fragmentos de anticuerpo pueden prepararse mediante diversas técnicas, incluyendo, pero sin limitación, la digestión proteolítica de un anticuerpo inalterado, así como la producción por células hospedadoras recombinantes. En algunos casos divulgados en el presente documento, los anticuerpos son fragmentos producidos de forma recombinante, tales como fragmentos que comprenden disposiciones que no se dan de manera natural, tales como aquellos con dos o más regiones de anticuerpos o cadenas unidas por enlazadores sintéticos, por ejemplo, enlazadores peptídicos y/o que pueden no producirse por digestión enzimática de un anticuerpo inalterado de origen natural. En algunos casos divulgados en el presente documento, los fragmentos de anticuerpos son scFv.

Un anticuerpo "humanizado" es un anticuerpo en el que todos o sustancialmente todos los restos de aminoácidos de la CDR provienen de CDR no humanas y todos o sustancialmente todos los restos de aminoácidos de la FR provienen de FR humanas. Un anticuerpo humanizado puede incluir opcionalmente al menos una porción de una región constante de anticuerpo que procede 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, típicamente para reducir la inmunogenicidad en seres humanos, a la vez que se conserva la especificidad y la afinidad del anticuerpo no humano precursor. En algunos casos divulgados en el presente documento, algunos residuos de FR en un anticuerpo humanizado se sustituyen por residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que proceden los residuos de la CDR), por ejemplo, para restablecer o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

Entre los anticuerpos divulgados se encuentran anticuerpos humanos. Un "anticuerpo humano" es un anticuerpo con una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana o una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpo humanos u otras secuencias codificantes de anticuerpos humanos, incluyendo bibliotecas de anticuerpos humanos. La expresión excluye formas humanizadas de anticuerpos no humanos que comprenden regiones de unión a antígeno no humanas, tales como aquellas en las que todas o sustancialmente todas las CDR son no humanas.

Pueden prepararse anticuerpos humanos administrando un inmunógeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir anticuerpos humanos inalterados o anticuerpos inalterados con regiones variables humanas en respuesta a la exposición a antígenos. Dichos animales típicamente contienen la totalidad o una porción de los locus de inmunoglobulina humanos, que sustituyen los locus endógenos de la inmunoglobulina, o que están presentes extracromosómicamente o integrados de forma aleatoria en los cromosomas de los animales. En dichos animales transgénicos, generalmente se han inactivado los locus de inmunoglobulina endógenos. Los anticuerpos humanos también pueden obtenerse de bibliotecas de anticuerpos humanos, incluyendo bibliotecas de presentación en fagos y sin células, que contienen secuencias codificantes de anticuerpos procedentes de un repertorio humano.

Entre los anticuerpos divulgados se encuentran los anticuerpos monoclonales, incluyendo fragmentos de anticuerpos monoclonales. Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de o dentro de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles variantes que contengan mutaciones naturales o que surjan durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, estando presentes dichas variantes generalmente en cantidades minoritarias. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que incluyen típicamente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes epítopos, cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales está dirigido contra un solo epítipo en un antígeno. No debe interpretarse que el término requiera la producción del anticuerpo por cualquier método concreto. Un anticuerpo monoclonal puede prepararse mediante una diversidad de técnicas, incluyendo, pero sin limitación, la generación a partir de un hibridoma, métodos de ADN recombinante, la presentación en fagos y otros métodos de presentación de anticuerpos.

a. Anticuerpos procedentes de SJ25C1

En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo antiidiotipo es específico para un anticuerpo anti CD19 diana que es o procede del anticuerpo SJ25C1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En algunos casos divulgados en el presente documento, los anticuerpos antiidiotipo o fragmentos de unión a antígeno de los mismos incluyen una región variable de cadena pesada (V_H) que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la región V_H expuesta en la SEQ ID NO: 52, tal como al menos un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la misma.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo antiidiotipo o fragmentos de unión a antígeno del mismo incluye una región variable de cadena pesada (V_H) que contiene una región determinante de complementariedad de cadena pesada 3 (CDR-H3) que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 53 o 54 y/o una CDR-H3 contenida dentro de la secuencia variable de cadena pesada (V_H) expuesta en la SEQ ID NO: 52.

En algunos de cualquiera de estos casos divulgados en el presente documento, la región V_H incluye una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (CDR-H1) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 55, 56, 57 o 58, y/o una CDR-H1 contenida dentro de la secuencia de V_H expuesta en la SEQ ID NO: 52; y/o una región determinante de complementariedad de cadena pesada 2 (CDR-H2) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 59, 60, 61 o 62 y/o una CDR-H2 contenida dentro de la secuencia de V_H expuesta en la SEQ ID NO: 52.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye una región variable de cadena pesada (V_H) que comprende una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (CDR-H1), CDR-H2 y CDR-H3, en donde la CDR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 55, 56, 57 o 58; la CDR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 59, 60, 61 o 62; y/o la CDR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 53 o 54. En algunos casos, se divulgan en el presente documento anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que incluyen una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 55, 56, 57 o 58; una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 59, 60, 61 o 62; y una CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 53 o 54.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo que incluye una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (CDR-H1), una CDR-H2 y una CDR-H3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de una CDR-H1, una CDR-H2 y una CDR-H3 contenidas dentro de la secuencia de aminoácidos de la región V_H expuesta en la SEQ ID NO: 52.

En algunos de cualquiera de estos casos divulgados en el presente documento, la región V_H contiene una región marco 1 (FR1), una secuencia FR2, una secuencia FR3 y/o una secuencia FR4 que tienen al menos un 90 % de identidad de secuencia, respectivamente, con una FR1, FR2, FR3 y/o FR4 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 52. En algunos casos divulgados en el presente documento, la región V_H contiene una región marco 1 (FR1), una secuencia FR2, una secuencia FR3 y/o una secuencia FR4 que tiene al menos un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia, respectivamente, con una FR1, FR2, FR3 y/o FR4 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 52. En algunos casos divulgados en el presente documento, la región V_H contiene una región marco 1 (FR1), una secuencia FR2, una secuencia FR3 y una secuencia FR4 que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia, respectivamente, con una FR1, FR2, FR3 y FR4 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 52.

En algunos de cualquiera de tales casos divulgados en el presente documento, la región V_H tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 52.

En algunos de cualquiera de estos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno es solo una cadena pesada, una V_H solo, y/o no incluye una V_L o una porción de unión a antígeno del mismo y/o el sitio de unión a antígeno del anticuerpo antiidiotipo o fragmento incluye solo residuos de la cadena pesada y/o no incluye residuos de una cadena ligera.

En algunos de cualquiera de estos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento no contiene una región variable de cadena ligera (V_L), no contiene una CDR-L1, CDR-L2 y/o CDR-L3 y/o es un anticuerpo de dominio único (sdAb) que contiene solo la región V_H . En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo o fragmento es un sdAb que solo contiene una región V_H de cualquiera de las descritas.

En algunos casos divulgados en el presente documento de cualquiera de los anticuerpos antiidiotipo o fragmentos que contienen cualquiera de las secuencias de la región V_H anteriores, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento comprende además una región variable de cadena ligera (V_L). En algunos de estos casos divulgados en el presente documento, la región V_L tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la región V_L expuesta en la SEQ ID NO: 63, tal como al menos un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la región V_L expuesta en la SEQ ID NO: 63.

En algunos de cualquiera de estos casos divulgados en el presente documento, la región V_L comprende una región

determinante de complementariedad de cadena ligera 3 (CDR-L3) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 64 o 65. En algunos de cualquiera de estos casos divulgados en el presente documento, la región V_L comprende una región determinante de complementariedad de cadena ligera 3 (CDR-L3) que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 64 o 65.

En algunos de cualquiera de estos casos divulgados en el presente documento, la región V_L comprende una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (CDR-L1) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 66 o 67, y/o una CDR-L1 contenida dentro de la secuencia de V_L expuesta en la SEQ ID NO: 63; y/o una región determinante de complementariedad de cadena ligera 2 (CDR-L2) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 68 o 69, y/o una CDR-L2 contenida dentro de la secuencia V_L expuesta en la SEQ ID NO: 63. En algunos de cualquiera de estos casos divulgados en el presente documento, la región V_L comprende una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (CDR-L1) que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 66 o 67, y/o una CDR-L1 contenida dentro de la secuencia V_L expuesta en la SEQ ID NO: 63; y/o una región determinante de complementariedad de cadena ligera 2 (CDR-L2) que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 68 o 69, y/o una CDR-L2 contenida dentro de la secuencia V_L expuesta en la SEQ ID NO: 63.

En algunos de cualquiera de estos casos divulgados en el presente documento, la región V_L comprende una CDR-L1 que contiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 66 o 67; una CDR-L2 que contiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 68 o 69; y una CDR-L3 que contiene la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 64 o 65.

En algunos de cualquiera de estos casos divulgados en el presente documento, la región V_L comprende la CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de una CDR-L1, una CDR-L2 y una CDR-L3 contenidas dentro de la secuencia de aminoácidos de la región V_L expuesta en la SEQ ID NO: 63.

En algunos de cualquiera de estos casos divulgados en el presente documento, la región V_L comprende una región marco 1 (FR1), una FR2, una FR3 y/o una FR4 que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia, respectivamente, con la FR1, FR2, FR3 y/o FR4 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 63. En algunos casos divulgados en el presente documento, la región V_L comprende una región marco 1 (FR1), una FR2, una secuencia FR3 y/o una secuencia FR4 que tiene al menos un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia, respectivamente, con una FR1, FR2, FR3 y/o FR4 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 63. En algunos casos divulgados en el presente documento, la región V_L comprende una región marco 1 (FR1), una FR2, una secuencia FR3 y una secuencia FR4 que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia, respectivamente, con una FR1, FR2, FR3 y FR4 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 63.

En algunos de cualquiera de estos casos divulgados en el presente documento, la región V_L tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 63.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo antiidiotipo o su fragmento de unión a antígeno comprende las secuencias de aminoácidos de secuencias de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 contenidas dentro de la secuencias de aminoácidos de la región V_H expuesta en la SEQ ID NO: 52; y/o comprenden las secuencias de aminoácidos de las secuencias de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 contenidas dentro de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (V_L) expuesta en la SEQ ID NO: 63.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye las regiones V_H y V_L que tienen secuencias de aminoácidos que tienen al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad con las SEQ ID NO: 52 y 63, respectivamente.

En algunos casos, se divulgan en el presente documento anticuerpos antiidiotipos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que incluyen las regiones V_H y V_L que tienen secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 52 y 63, respectivamente.

En algunos de cualquiera de estos casos divulgados en el presente documento, las regiones V_H y V_L incluyen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 52 y 63, respectivamente.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo antiidiotipo específico del anticuerpo SJ25C1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo es un fragmento de anticuerpo monocatenario, tal como un scFv o diacuerpo. En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo monocatenario incluye uno o más enlazadores que se unen a dos dominios o regiones de anticuerpo, tal como una región de cadena pesada variable (V_H) y una cadena ligera variable (V_L). El enlazador típicamente es un enlazador peptídico, por ejemplo, un enlazador peptídico flexible y/o soluble. Entre los enlazadores se encuentran los ricos en glicina y serina y/o en algunos casos treonina. En algunos casos divulgados en el presente documento, los enlazadores incluyen además residuos cargados tales como lisina y/o glutamato, que pueden mejorar la solubilidad. En algunos casos divulgados en el presente documento, los enlazadores incluyen además una o más prolinas.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo antiidiotipo es un anticuerpo inalterado o un anticuerpo de longitud completa. En algunos casos divulgados en el presente documento, el anti ID puede contener al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina, tal como uno o más dominios de región constante.

En algunos casos divulgados en el presente documento, las regiones constantes incluyen una región constante de cadena ligera (CL) y/o una región constante de cadena pesada 1 (CH1). En algunos casos divulgados en el presente documento, el anti ID incluye un dominio CH2 y/o CH3, tal como una región Fc. En algunos casos divulgados en el presente documento, la región Fc es una región Fc de una IgG humana, tal como IgG1 o IgG4. En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo antiidiotipo contiene el dominio CH expuesto en la SEQ ID NO:115 o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:115. En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo antiidiotipo contiene el dominio CL expuesto en la SEQ ID NO:118 o una porción del mismo o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:118 o una porción de la misma.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo antiidiotipo específico para SJ25C1 comprende la secuencia de cadena pesada expuesta en la SEQ ID NO:116 o una secuencia que exhibe al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:116 y/o comprende la secuencia de cadena ligera expuesta en la SEQ ID NO:119 o una secuencia que exhibe al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:119. En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo antiidiotipo específico para SJ25C1 comprende la secuencia de la cadena pesada expuesta en la SEQ ID NO:116 y/o la secuencia de la cadena ligera expuesta en la SEQ ID NO:119. En algunos casos divulgados en el presente documento, la cadena pesada y/o la cadena ligera del anticuerpo antiidiotipo comprende además un péptido señal. En algunos casos, el péptido señal tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:117 o la SEQ ID NO:120.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo antiidiotipo es un fragmento de unión a antígeno. En algunos casos divulgados en el presente documento, el fragmento de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en fragmentos de unión a antígeno del fragmento (Fab), fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fab', fragmentos Fv, un fragmento variable monocatenario (scFv) o un anticuerpo de dominio único (sdAb).

Por consiguiente, se divulgan fragmentos de anticuerpo monocatenario, tales como scFv y diacuerpos, en particular, fragmentos monocatenarios humanos, que comprenden típicamente uno o más enlazadores que unen dos dominios o regiones de anticuerpo antiidiotipo, tales como los dominios V_H y V_L. El enlazador típicamente es un enlazador peptídico, por ejemplo, un enlazador peptídico flexible y/o soluble, tal como uno rico en glicina y serina.

En algunos casos divulgados en el presente documento, los enlazadores ricos en glicina y serina (y/o treonina) incluyen al menos un 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o un 99 % de dicho uno o más aminoácidos. En algunos casos divulgados en el presente documento, incluyen al menos o aproximadamente el 50 %, 55 %, 60 %, 70 % o un 75 %, de glicina, serina y/o treonina. En algunos casos divulgados en el presente documento, el enlazador está compuesto sustancialmente por completo por glicina, serina y/o treonina. Los enlazadores tienen generalmente una longitud de entre o entre aproximadamente 5 y 50 aminoácidos, típicamente entre o entre aproximadamente 10 y entre o entre aproximadamente 30, por ejemplo, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30, y en algunos casos divulgados en el presente documento tienen una longitud de entre 10 y 25 aminoácidos. Los enlazadores de ejemplo incluyen enlazadores que tienen diversos números de repeticiones de la secuencia GGS (3GS; SEQ ID NO: 70) o GGGGS (4GS; SEQ ID NO: 27), tal como entre 2, 3, 4 y 5 repeticiones de tal secuencia. Los enlazadores de ejemplo incluyen los que tienen o consisten en una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 71 (GGGSGGGSGGGSGGGGS). Los enlazadores de ejemplo incluyen además los que tienen o consisten en la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 72 (GSTSGSGKPGSGEGSTKG).

En algunos casos divulgados en el presente documento, los anticuerpos antiidiotipo incluyen anticuerpos aislados. En algunos casos divulgados en el presente documento, el anti ID es humanizado, recombinante y/o monoclonal. En algunos casos divulgados en el presente documento, el anti ID es humano.

b. Anticuerpos procedentes de FMC63

En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo antiidiotipo es específico para un anticuerpo anti CD19 diana que es o procede del anticuerpo FMC63 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye una región variable de cadena pesada (VH) que comprende al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la región V_H expuesta en la SEQ ID NO: 73 o 74, tal como al menos un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la misma.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo

incluye una región VH que tiene una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (CDR-H1) que contiene la secuencia de aminoácidos de GYX₃FX₅X₆YX₈MX₁₀ (SEQ ID NO: 95), en donde X₃ es T o S, X₅ es T o S, X₆ es D o R, X₈ es Y o W, y X₁₀ es K o N; y/o una región determinante de complementariedad de cadena pesada 2 (CDR-H2) que contiene la secuencia de aminoácidos de WIGX₄IX₆PX₈X₉X₁₀X₁₁TX₁₃X₁₄NQX₁₇FKX₂₀ (SEQ ID NO: 96), en donde X₄ es D o M, X₆ es N o H, X₈ es N o S, X₉ es N o D, X₁₀ es G o S, X₁₁ es G o E, X₁₃ es D o R, X₁₄ es Y o L, X₁₇ es N o K y X₂₀ es G o D; y/o una región determinante de complementariedad de cadena pesada 3 (CDR-H3) que contiene la secuencia de aminoácidos de AX₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅ (SEQ ID NO: 97), en donde X₂ es R o S, X₃ es E o I, X₄ es G o Y, X₅ es N o Y, X₆ es N o E, X₇ es Y o nulo, X₈ es G o nulo, X₉ es S o nulo, X₁₀ es R o nulo, X₁₁ es D o nulo, X₁₂ es A o nulo, X₁₃ es M o nulo, X₁₄ es D o E y X₁₅ es Y o A.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye una región variable de cadena pesada (VH) que contiene una región determinante de complementariedad de cadena pesada 3 (CDR-H3) que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 75, 76, 77 o 78 y/o una CDR-H3 contenida dentro de la secuencia variable de cadena pesada (V_H) expuesta en la SEQ ID NO: 73 o 74.

En algunos de cualquiera de estos casos divulgados en el presente documento, la región V_H incluye una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (CDR-H1) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85 u 86 y/o una CDR-H1 contenida dentro de la secuencia de V_H expuesta en la SEQ ID NO: 73 o 74; y/o una región determinante de complementariedad de cadena pesada 2 (CDR-H2) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93 o 94 y/o una CDR-H2 contenida dentro de la secuencia de V_H expuesta en las SEQ ID NO: 73 o 74.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (CDR-H1), CDR-H2 y CDR-H3, en donde la CDR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85 u 86; una CDR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93 o 94; y/o la CDR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 75, 76, 77 o 78. En algunos casos, se divulgan en el presente documento anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que incluyen una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85 u 86; una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93 o 94; y una CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 75, 76, 77 o 78.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo antiidiotipo o fragmentos de unión a antígeno del mismo incluye una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (CDR-H1), una CDR-H2 y una CDR-H3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de una CDR-H1, una CDR-H2 y una CDR-H3 contenidas dentro de la secuencia de aminoácidos de la región V_H expuesta en la SEQ ID NO: 73 o 74.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye una CDR-H1 expuesta en las SEQ ID NO: 79, 81, 82, 83; una CDR-H2 expuesta en las SEQ ID NO: 87, 89, 90, 91; y/o una CDR-H3 expuesta en las SEQ ID NO: 71 o 77. En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye una CDR-H1 expuesta en la SEQ ID NO: 80, 84, 85, 86; una CDR-H2 expuesta en la SEQ ID NO: 88, 92, 93, 94; y/o una CDR-H3 expuesta en la SEQ ID NO: 76, 78, respectivamente.

En algunos de cualquiera de estos casos divulgados en el presente documento, la región V_H contiene una región marco 1 (FR1), una secuencia FR2, una secuencia FR3 y/o una secuencia FR4 que tienen al menos un 90 % de identidad de secuencia, respectivamente, con una FR1, FR2, FR3 y/o FR4 de la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 73 o 74. En algunos casos divulgados en el presente documento, la región V_H contiene una región marco 1 (FR1), una secuencia FR2, una secuencia FR3 y/o una secuencia FR4 que tiene al menos un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia, respectivamente, con una FR1, FR2, FR3 y/o FR4 de la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 73 o 74. En algunos casos divulgados en el presente documento, la región V_H contiene una región marco 1 (FR1), una secuencia FR2, una secuencia FR3 y una secuencia FR4 que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia, respectivamente, con una FR1, FR2, FR3 y FR4 de la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 73 o 74.

En algunos de cualquiera de tales casos divulgados en el presente documento, la región V_H tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 73 o 74.

En algunos de cualquiera de estos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno es solo una cadena pesada, una VH solo, y/o no incluye una VL o una porción de unión a antígeno del mismo y/o el sitio de unión a antígeno del anticuerpo antiidiotipo o fragmento incluye solo residuos de la cadena pesada y/o no incluye residuos de una cadena ligera.

En algunos de cualquiera de estos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento no contiene una región variable de cadena ligera (V_L), no contiene una CDR-L1, CDR-L2 y/o CDR-L3 y/o es un anticuerpo de dominio único (sdAb) que contiene solo la región V_H . En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo o fragmento es un sdAb que solo contiene una región V_H de cualquiera de las descritas.

5 En algunos casos divulgados en el presente documento de cualquiera de los anticuerpos antiidiotipo o fragmentos que contienen cualquiera de las secuencias de la región V_H anteriores, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento comprende además una región variable de cadena ligera (V_L). En algunos de estos casos divulgados en el presente documento, la región V_L tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la región V_L
10 expuesta en las SEQ ID NO: 98 o 99, tal como al menos un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la región V_L expuesta en las SEQ ID NO: 98 o 99.

En algunos casos, se divulgan en el presente documento anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que incluyen una región V_H que tiene una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (CDR-L1) que contiene la secuencia de aminoácidos de $X_1AX_3X_4X_5X_6X_7X_8YX_{10}X_{11}WY$ (SEQ ID NO: 112), en donde X_1 es S o R, X_3 es S o R, X_4 es S o G, X_5 es G o N, X_6 es V o I, X_7 es I o H, X_8 es N o nulo, X_{10} es M o L y X_{11} es Y o A; y/o una región determinante de complementariedad de cadena ligera 2 (CDR-L2) que contiene la secuencia de aminoácidos de $X_1X_2X_3YX_5X_6X_7X_8LAX_{11}$ (SEQ ID NO: 113), en donde X_1 es P o L, X_2 es W o L, X_3 es I o V, X_5 es L o N, X_6 es T o A, X_7 es S o K, X_8 es N o T y X_{11} es S o D; y/o una región determinante de complementariedad de cadena ligera 3 (CDR-L3) que contiene la secuencia de aminoácidos de $QX_2X_3X_4X_5X_6PX_8T$ (SEQ ID NO: 114), donde X_2 es Q o H, X_3 es W o F, X_4 es S o W, X_5 es S o W, X_6 es N o T y X_8 es I o Y.

En algunos de cualquiera de estos casos divulgados en el presente documento, la región V_L comprende una región determinante de complementariedad de cadena ligera 3 (CDR-L3) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 100, 101, 102 o 103. En algunos de cualquiera de estos casos divulgados en el presente documento, la región V_L comprende una región determinante de complementariedad de cadena ligera 3 (CDR-L3) que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 100, 101, 102 o 103.

En algunos de cualquiera de estos casos divulgados en el presente documento, la región V_L comprende una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (CDR-L1) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 104, 105, 106 o 107 y/o una CDR-L1 contenida dentro de la secuencia de V_L expuesta en la SEQ ID NO: 98 o 99; y/o una región determinante de complementariedad de cadena ligera 2 (CDR-L2) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 108, 109, 110 o 111 y/o una CDR-L2 contenida dentro de la secuencia de V_L expuesta en la SEQ ID NO: 98 o 99. En algunos de cualquiera de estos casos divulgados en el presente documento, la región V_L contiene una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (CDR-L1) que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 104, 105, 106 o 107 y/o una CDR-L1 contenida dentro de la secuencia de V_L expuesta en la SEQ ID NO: 98 o 99; y/o una región determinante de complementariedad de cadena ligera 2 (CDR-L2) que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 108, 109, 110 o 111 y/o una CDR-L2 contenida dentro de la secuencia de V_L expuesta en la SEQ ID NO: 98 o 99.

En algunos de cualquiera de estos casos divulgados en el presente documento, la región V_L comprende una CDR-L1 que contiene la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 104, 105, 106 o 107; una CDR-L2 que contiene la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 108, 109, 110 o 111; y una CDR-L3 que contiene la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 100, 101, 102 o 103.

En algunos de cualquiera de estos casos divulgados en el presente documento, la región V_L comprende la CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de una CDR-L1, una CDR-L2 y una CDR-L3 contenidas dentro de la secuencia de aminoácidos de la región V_L expuesta en la SEQ ID NO: 98 o 99.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye una CDR-L1 expuesta en las SEQ ID NO: 104 o 106; una CDR-L2 expuesta en las SEQ ID NO: 108 o 110; y/o una CDR-L3 expuesta en las SEQ ID NO: 100 o 101. En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye una CDR-L1 expuesta en las SEQ ID NO: 105 o 107; una CDR-L2 expuesta en las SEQ ID NO: 109 o 111; y/o una CDR-L3 expuesta en las SEQ ID NO: 102 o 103, respectivamente.

En algunos de cualquiera de estos casos divulgados en el presente documento, la región V_L comprende una región marco 1 (FR1), una FR2, una FR3 y/o una FR4 que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia, respectivamente, con la FR1, FR2, FR3 y/o FR4 de la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 98 o 99. En algunos casos divulgados en el presente documento, la región V_L comprende una región marco 1 (FR1), una FR2, una secuencia FR3 y/o una secuencia FR4 que tiene al menos un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia, respectivamente, con una FR1, FR2, FR3 y/o FR4 de la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 98 o 99. En algunos casos divulgados en el presente documento, la región V_L comprende una región marco 1 (FR1), una FR2, una secuencia FR3 y una secuencia FR4 que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia, respectivamente, con una FR1, FR2, FR3 y FR4 de la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 98 o 99.

En algunos de cualquiera de estos casos divulgados en el presente documento, la región V_L tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 98 o 99.

5 En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo antiidiotipo o su fragmento de unión a antígeno comprende las secuencias de aminoácidos de secuencias de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 contenidas dentro de la secuencias de aminoácidos de la región V_H expuesta en la SEQ ID NO: 73 o 74; y/o comprenden las secuencias de aminoácidos de las secuencias de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 contenidas dentro de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (VL) expuesta en la SEQ ID NO: 98 o 99.

10 En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo antiidiotipo o fragmentos de unión a antígeno del mismo incluye la región V_H que tiene las secuencias de aminoácidos que tienen al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad con las SEQ ID NO: 73 o 74 y la región V_L que tiene las secuencias de aminoácidos que tienen al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad con las SEQ ID NO: 98 o 99.

15 En algunos casos, se divulgan en el presente documento anticuerpos antiidiotipos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que incluyen la región V_H que tiene las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 73 o 74 y la región V_L que tiene las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 98 o 99. En algunos de los casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo divulgado contiene la región V_H expuesta en la SEQ ID NO: 73 y la región V_L expuesta en la SEQ ID NO: 98. En algunos de los casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo divulgado contiene la región V_H expuesta en la SEQ ID NO: 74 y la región V_L expuesta en las SEQ ID NO: 99.

25 En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo antiidiotipo es un fragmento de anticuerpo monocatenario, tal como un scFv o diacuerpo. En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo monocatenario incluye uno o más enlazadores que se unen a dos dominios o regiones de anticuerpo, tal como una región de cadena pesada variable (V_H) y una cadena ligera variable (V_L). El enlazador típicamente es un enlazador peptídico, por ejemplo, un enlazador peptídico flexible y/o soluble. Entre los enlazadores se encuentran los ricos en glicina y serina y/o en algunos casos treonina. En algunos casos divulgados en el presente documento, los enlazadores incluyen además residuos cargados tales como lisina y/o glutamato, que pueden mejorar la solubilidad. En algunos casos divulgados en el presente documento, los enlazadores incluyen además una o más prolinas.

30 En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo antiidiotipo es un anticuerpo inalterado o un anticuerpo de longitud completa. En algunos casos divulgados en el presente documento, el anti ID puede contener al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina, tal como uno o más dominios de región constante. En algunos casos divulgados en el presente documento, las regiones constantes incluyen una región constante de cadena ligera (CL) y/o una región constante de cadena pesada 1 (CH1). En algunos casos divulgados en el presente documento, el anti ID incluye un dominio CH2 y/o CH3, tal como una región Fc. En algunos casos divulgados en el presente documento, la región Fc es una región Fc de una IgG humana, tal como IgG1 o IgG4. En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo antiidiotipo contiene el dominio CH expuesto en la SEQ ID NO: 121 o 127 o una porción del mismo o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 121 o 127 o una porción de la misma. En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo antiidiotipo contiene el dominio CL expuesto en la SEQ ID NO: 124 o 130 o una porción del mismo o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 124 o 130 o una porción de la misma.

35 En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo antiidiotipo específico para SJ25C1 comprende la secuencia de cadena pesada expuesta en la SEQ ID NO:122 o 128 o una secuencia que exhibe al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:122 o 128 y/o comprende la secuencia de cadena ligera expuesta en la SEQ ID NO:125 o 131 o una secuencia que exhibe al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:125 o 131. En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo antiidiotipo específico para SJ25C1 comprende la secuencia de la cadena pesada expuesta en la SEQ ID NO:122 y/o la secuencia de la cadena ligera expuesta en la SEQ ID NO:131. En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo antiidiotipo específico para SJ25C1 comprende la secuencia de la cadena pesada expuesta en la SEQ ID NO:128 y/o la secuencia de la cadena ligera expuesta en la SEQ ID NO:131. En algunos casos divulgados en el presente documento, la cadena pesada y/o la cadena ligera del anticuerpo antiidiotipo comprende además un péptido señal. En algunos casos, el péptido señal tiene la secuencia expuesta en las SEQ ID NO:123, 126, 129 o 132.

40 En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo antiidiotipo es un fragmento de unión a antígeno. En algunos casos divulgados en el presente documento, el fragmento de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en fragmentos de unión a antígeno del fragmento (Fab), fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fab', fragmentos Fv, un fragmento variable monocatenario (scFv) o un anticuerpo de dominio único (sdAb).

Por consiguiente, se divulgan fragmentos de anticuerpo monocatenario, tales como scFv y diacuerpos, en particular, fragmentos monocatenarios humanos, que comprenden típicamente uno o más enlazadores que unen dos dominios o regiones de anticuerpo antiidiotipo, tales como los dominios V_H y V_L. El enlazador típicamente es un enlazador peptídico, por ejemplo, un enlazador peptídico flexible y/o soluble, tal como uno rico en glicina y serina.

En algunos casos divulgados en el presente documento, los enlazadores ricos en glicina y serina (y/o treonina) incluyen al menos un 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o un 99 % de dicho uno o más aminoácidos. En algunos casos divulgados en el presente documento, incluyen al menos o aproximadamente el 50 %, 55 %, 60 %, 70 % o un 75 %, de glicina, serina y/o treonina. En algunos casos divulgados en el presente documento, el enlazador está compuesto sustancialmente por completo por glicina, serina y/o treonina. Los enlazadores tienen generalmente una longitud de entre o entre aproximadamente 5 y 50 aminoácidos, típicamente entre o entre aproximadamente 10 y entre o entre aproximadamente 30, por ejemplo, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30, y en algunos casos divulgados en el presente documento tienen una longitud de entre 10 y 25 aminoácidos. Los enlazadores de ejemplo incluyen enlazadores que tienen diversos números de repeticiones de la secuencia GGGG (3GS; SEQ ID NO: 70) o GGGGS (4GS; SEQ ID NO: 27), tal como entre 2, 3, 4 y 5 repeticiones de tal secuencia. Los enlazadores de ejemplo incluyen los que tienen o consisten en una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 71 (GGGGSGGGSGGGGS). Los enlazadores de ejemplo incluyen además los que tienen o consisten en la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 72 (GSTSGSGKPGSGEGSTKG).

En algunos casos divulgados en el presente documento, los anticuerpos antiidiotipo incluyen anticuerpos aislados. En algunos casos divulgados en el presente documento, el anti ID es humanizado, recombinante y/o monoclonal. En algunos casos divulgados en el presente documento, el anti ID es humano.

3. Componentes adicionales

En determinados casos divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, partículas de perlas, comprenden una molécula de unión conjugada en la superficie o unida de otro modo que se une a o se reconoce por un dominio de unión a antígeno de un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR, y uno o más agentes adicionales que son capaces de unirse y/o reconocer a una molécula adicional en la célula. En algunos casos divulgados en el presente documento, el uno o más agentes adicionales son una molécula de unión adicional. En algunos casos divulgados en el presente documento, la una o más moléculas de unión adicionales son anticuerpos (o fragmentos o variantes de los mismos) que se unen a polipéptidos (por ejemplo, glucoproteínas) que están presentes en la superficie de las células que expresan el receptor recombinante. En casos particulares divulgados en el presente documento, la una o más moléculas de unión adicionales son polipéptidos o porciones de los mismos que se unen a una molécula de la superficie celular, tal como un receptor, por ejemplo, activador, coestimulador o correceptor, expresado en la superficie de una célula, tal como una célula que expresa el receptor recombinante. En casos particulares divulgados en el presente documento, la una o más moléculas de unión adicionales son ligandos o porciones de los mismos que se unen a polipéptidos que están presentes en la superficie de las células, tales como células que expresan el receptor recombinante. En determinados casos divulgados en el presente documento, el uno o más agentes adicionales están expuestos en la superficie de la partícula.

En casos particulares divulgados en el presente documento, el uno o más agentes adicionales pueden modular una función de las células, por ejemplo, la expansión, mediante la unión a la molécula adicional en la superficie de la célula. En algunos casos divulgados en el presente documento, el agente se une a la molécula adicional en la célula y activa una señal accesoria en la célula, es decir, la unión del agente adicional a la molécula adicional en la superficie celular tiene los mismos efectos o efectos similares en una o más funciones celulares, por ejemplo, la expansión, que la unión de una molécula accesoria a la molécula adicional en la superficie de la célula. En algunos casos divulgados en el presente documento, el agente adicional es un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a o reconoce la molécula adicional en la superficie celular. En casos particulares divulgados en el presente documento, el agente es un ligando o una porción del mismo que se une a o reconoce la molécula adicional en la superficie de la célula.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula reconocida o unida por el uno o más agentes adicionales es CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD25, CD27, CD28, CD29, CD31, CD44, CD45RA, CD45RO, CD54 (ICAM-1), CD127, MHCI, MHCII, CTLA-4, ICOS, ICOSL, PD-1 (CD279), PD-L1 (CD274, B7-H1), PDL2 (CD273, B7-DC), OX40 (CD134, TNFRSF4), OX-40L, DAP10, CD27L (CD70), 4-1BB (CD137), 4-1BBL, CD30L, LIGHT, IL-2R, IL-12R, IL-1R, IL-15R; IFN-gammaR, TNF-alfaR, IL-4R, IL-10R, CD18/CD11a (LFA-1), CD62L (L-selectina), CD29/CD49d (VLA-4), ligando Notch (por ejemplo, tipo Delta 1/4, Jagged 1/2, etc.), CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7, CXCR3, CTLA-4, LAG-3 (CD223), TIM-3, 4-1BB (CD137), GITR (TNFRSF18, AITR), CD40, CXCR2, antígenos asociados a tumores (TAA), B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, GAL9, B7H3, B7H4, VISTA, KIR, 2B4 (pertenece a la familia de moléculas de CD2 y se expresa en todos los linfocitos NK, γδ y linfocitos T CD8 + (αβ) de memoria), CD160 (también denominado BY55), CGEN-15049, CEACAM (por ejemplo, CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), TIGIT, CD155, CD155, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), LIGHT, KIR, A2aR, MHC de clase I, MHC de clase II, GAL9, adenosina o un receptor del factor de crecimiento transformante (TGFR; por ejemplo, TGFR beta).

En algunos casos divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, comprenden una molécula de unión conjugada en la superficie o unida de otro modo que se une a o se reconoce por un dominio de unión a antígeno de un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR, y una o más moléculas de unión adicionales que se unen a una molécula de punto de control, tal como un receptor inhibidor o receptor activador o ligando del mismo. En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión contiene el dominio extracelular o la porción de unión del mismo de un receptor inhibidor o ligando del mismo o receptor activador o ligando del mismo. En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión está fusionada a un dominio de multimerización, tal como una región o dominio Fc. En casos particulares divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, comprenden una molécula de unión conjugada en la superficie o unida de otro modo que se une a o se reconoce por un dominio de unión a antígeno de un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR, y una o más moléculas de unión adicionales que se unen a OX-40, ICOS, DAP10, CD28 o 4-1BB, CTLA-4, PD-1, LAG-3, Tim-3, BTLA o TIGIT. En algunos casos divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, comprenden una molécula de unión conjugada en la superficie o unida de otro modo que se une a o se reconoce por un dominio de unión a antígeno de un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR, y una o más moléculas de unión adicionales que se unen a OX-40L, ICOSL, B7-1, B7-2 o 4-1BBL, PD-L1, PD-L2, CD155, CD112 o LIGHT.

En casos particulares divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, comprenden una molécula de unión conjugada en la superficie o unida de otro modo que se une a o se reconoce por un dominio de unión a antígeno de un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR, y una o más moléculas de unión adicionales, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos o variantes de los mismos, que se unen a CD3 y/o CD28. En algunos casos divulgados en el presente documento, la una o más moléculas adicionales se unen a CD2 o CD28. En casos particulares divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, comprenden una molécula de unión conjugada en la superficie o unida de otro modo que se une a o se reconoce por un dominio de unión a antígeno de un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR, y una o más moléculas de unión adicionales que se unen a CD28.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la partícula contiene una molécula de unión conjugada en la superficie y un agente conjugado en la superficie adicional que se une a CD2. En determinados casos divulgados en el presente documento, la partícula contiene una molécula de unión conjugada en la superficie y un anticuerpo anti CD2 conjugado en la superficie. En casos particulares divulgados en el presente documento, la partícula contiene una molécula de unión conjugada en la superficie y un agente conjugado en la superficie adicional que se une a CD28. En diversos casos divulgados en el presente documento, la partícula contiene una molécula de unión conjugada en la superficie y un anticuerpo anti CD28 conjugado en la superficie. En algunos casos divulgados en el presente documento, la partícula contiene una molécula de unión conjugada en la superficie y agentes conjugados en la superficie adicionales que se unen a CD2 y CD28. En diversos casos divulgados en el presente documento, la partícula contiene una molécula de unión conjugada en la superficie y anticuerpos anti CD2 y anti CD28 conjugados en la superficie. En determinados casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión es o contiene un antígeno BCMA, ROR1 o CD22 o un fragmento que contiene un epítipo. En determinados casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión es un anti ID que se une a o reconoce un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR.

En casos particulares divulgados en el presente documento, la partícula contiene un anti ID conjugado en la superficie, por ejemplo, un anti ID que se une a o reconoce un CAR, tal como un CAR anti CD19, y un anticuerpo anti CD2 conjugado en la superficie. En determinados casos divulgados en el presente documento, la partícula contiene un anti ID conjugado en la superficie, por ejemplo, un anti ID que se une a o reconoce un CAR, tal como un CAR anti CD19, y un anticuerpo anti CD28 conjugado en la superficie. En diversos casos divulgados en el presente documento, la partícula contiene un anti ID conjugado en la superficie, por ejemplo, un anti ID que se une a o reconoce un CAR, tal como un CAR anti CD19, y anticuerpos anti CD2 y anti CD28 conjugados en la superficie.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la relación, tal como la relación molar o en peso, de la molécula de unión y el agente o molécula adicional es de o de aproximadamente 1:10 a 10:1, tal como de 1:5 a 5:1 o de 1:2 o de 2:1, o es de aproximadamente 1:1. En determinados casos divulgados en el presente documento, la relación, tal como la relación molar o en peso, de la molécula de unión con respecto a los dos agentes adicionales es de o es de aproximadamente 1:1:1.

C. Métodos de conjugación

En el presente documento se divulgan partículas (por ejemplo, partículas de perlas) que están conjugadas y/o unidas a moléculas de unión (por ejemplo, antígeno polipeptídico o anticuerpo) que se unen o reconocen un receptor recombinante (por ejemplo, un CAR). Pueden usarse diversos medios, bien conocidos en la técnica, para conjugar moléculas de unión, por ejemplo, antígenos polipeptídicos y anticuerpos antiidiotipo, con partículas (por ejemplo, partículas de perlas). Estos métodos incluyen cualquier química estándar que no destruya ni limite gravemente la actividad biológica o la estructura de la molécula de unión, y que permita que se conjugue una cantidad suficiente de moléculas de unión con la partícula de una manera que permita una interacción de la molécula de unión, por ejemplo, péptido antigénico o proteína, con el receptor recombinante. En algunos casos divulgados en el presente documento, se selecciona un método de conjugación que conjuga la región en el extremo C de la molécula de unión, por ejemplo, una molécula de unión polipeptídica, con la partícula. Un experto en la técnica entenderá que las químicas exactas

para la conjugación pueden depender de la naturaleza del material de la partícula, los grupos funcionales expuestos en la superficie de la partícula, la presencia o ausencia de fusiones en el extremo C a la molécula de unión y la presencia o ausencia de fracciones de conjugación. Cualquiera que sea la química elegida, es importante que el método de conjugación no altere la función y/o la confirmación estructural de la molécula de unión. Por ejemplo, si la molécula de unión es un antígeno, el método seleccionado para conjugar el antígeno con la partícula no debe impedir que el antígeno sea reconocido por su receptor conjugado. En determinados casos divulgados en el presente documento, si la molécula de unión es un anticuerpo, por ejemplo, un anti ID, el método de conjugación no debe impedir que el anticuerpo se una a su antígeno diana.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión (por ejemplo, un antígeno polipeptídico o anti ID) se une a la partícula (por ejemplo, una partícula de perla) mediante absorción pasiva a la superficie plana de la partícula. La unión mediante este método se basa típicamente en interacciones hidrófobas que unen la molécula de unión a la perla. Si bien este método es relativamente sencillo, en algunos casos divulgados en el presente documento, el método proporciona poco control sobre la orientación final de la molécula unida con respecto a otras técnicas de unión de la molécula de unión, tal como cualquiera de las técnicas analizadas en el presente documento, tal como en la Sección I-C.

1. Unión a la superficie de la partícula

En determinados casos divulgados en el presente documento, las moléculas de unión se unen al portador a través de un enlace químico covalente. En casos particulares divulgados en el presente documento, la molécula de unión es un polipéptido y un grupo reactivo o resto de un aminoácido se conjuga directamente con un grupo reactivo o resto en la superficie de la partícula mediante una reacción química directa. En determinados casos divulgados en el presente documento, un grupo carboxilo de aminoácido (por ejemplo, un grupo carboxilo en el extremo C), un grupo hidroxilo, tiol o amina (tal como un grupo de cadena lateral de aminoácido) de la molécula de unión se conjuga directamente con un grupo hidroxilo o carboxilo de un polímero PLA o PGA, un grupo amina o carboxilo terminal de un dendrímero, o un grupo hidroxilo, carboxilo o fosfato de un fosfolípido en la superficie de la partícula mediante una reacción química directa. En algunos casos divulgados en el presente documento, un resto de conjugación se conjuga, por ejemplo, se une covalentemente, tanto con la molécula de unión como con la partícula, uniéndolas así entre sí.

En determinados casos divulgados en el presente documento, la superficie de la partícula comprende restos químicos y/o grupos funcionales que permiten la unión (por ejemplo, covalente, no covalente) de la molécula de unión (por ejemplo, antígeno polipeptídico o anticuerpo). En algunos casos divulgados en el presente documento, el número, la orientación, el espaciado, etc. de los restos químicos y/o grupos funcionales en la partícula varían según la química de la partícula y las propiedades de la molécula de unión. En casos particulares divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, tienen superficies modificadas introducidas. En casos particulares divulgados en el presente documento, las superficies de las partículas contienen grupos funcionales expuestos. Los grupos funcionales expuestos en la superficie adecuados incluyen, pero sin limitación, grupos carboxilo, amino, hidroxilo, grupos sulfato, tosilo, epoxi y clorometilo.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión es un polipéptido y está conjugada con los grupos funcionales expuestos en la superficie. En algunos casos divulgados en el presente documento, el grupo funcional expuesto en la superficie debe activarse, es decir, debe experimentar una reacción química para producir un producto intermedio capaz de unirse directamente a un polipéptido. Los casos particulares divulgados en el presente documento contemplan que la activación de los grupos funcionales expuestos en la superficie de una partícula para permitir la conjugación de una molécula de unión es una cuestión de habilidad rutinaria en la técnica, y que un experto identificaría fácilmente reactivos y protocolos adecuados para realizar cualquier etapa de activación necesaria para conjugar una molécula de unión a una partícula.

En algunos casos divulgados en el presente documento, para unir una molécula de unión de polipéptido a una partícula carboxilada, por ejemplo, una partícula de perla, los grupos carboxilo expuestos en la superficie de la partícula requieren activación poniendo en contacto el grupo funcional con un agente que producirá un éster intermedio que es capaz de unirse directamente a un grupo amina. Los grupos carboxilo reactivos (es decir, activados) en la superficie de una partícula pueden conjugarse con aminas libres (por ejemplo, de residuos Lys) en el polipéptido. Los agentes adecuados incluyen, por ejemplo, pero sin limitación, carbodiimida (EDC), carbodiimida de etileno (ECDI), diisocianato de hexametileno, éter diglicidílico de propilenglicol que contiene 2 residuos de epoxi, epiclorhidrina, N-hidroxisuccinimida (NHS) o sulfo-NHS o etilo (dimetilaminopropilo). En algunos casos divulgados en el presente documento, una molécula de unión polipeptídica está unida covalentemente a una partícula en un grupo carboxilo expuesto en la superficie. En casos particulares divulgados en el presente documento, la molécula de unión polipeptídica está unida covalentemente al grupo carboxilo expuesto en la superficie poniendo en contacto primero el grupo carboxilo con un agente para generar un éster intermedio.

En algunos casos divulgados en el presente documento, un grupo funcional de la molécula de unión polipeptídica se activa antes de conjugar el polipéptido con un grupo funcional expuesto en la superficie. Por ejemplo, un grupo carboxilo de la molécula polipeptídica puede activarse con los agentes descritos anteriormente para generar ésteres intermedios capaces de unirse directamente a grupos amino expuestos en la superficie de la partícula. En algunos

casos divulgados en el presente documento, una molécula de unión polipeptídica se conjuga con la partícula en un grupo amina expuesto en la superficie. En casos particulares divulgados en el presente documento, un grupo carboxilo de la molécula de unión polipeptídica se pone en contacto con un agente para generar un éster intermedio antes de unir covalentemente la partícula al grupo carboxilo expuesto en la superficie de la partícula. Como alternativa, los grupos amina libres en la superficie de un portador se pueden unir covalentemente a péptidos y proteínas antigénicas, o proteínas de fusión de péptidos o proteínas antigénicas, usando la química del (4-yodoacetil)aminobenzoato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SIAB).

En casos particulares divulgados en el presente documento, una molécula de unión polipeptídica se une covalentemente a la partícula, por ejemplo, una partícula de perla, en un grupo funcional expuesto en la superficie que no requiere activación por un agente antes de formar una unión covalente. Los ejemplos de dichos grupos funcionales incluyen, pero sin limitación, grupos tosilo, tosilo, epoxi y clorometilo. En casos particulares divulgados en el presente documento, la unión covalente se puede realizar en presencia de tampones específicos, en intervalos de pH específicos, a intervalos de temperatura específicos y durante cantidades específicas de tiempo que pueden identificarse y realizarse fácilmente para cualquier grupo funcional de este tipo por un experto en la técnica. Por ejemplo, en algunos casos divulgados en el presente documento, los grupos tosilo en la superficie de la partícula se unen a grupos amino o sulfhidrilo de una molécula de unión (por ejemplo, un antígeno polipeptídico o anticuerpo) dependiendo del pH. Se usa un pH neutro para unir grupos sulfhidrilo de un polipéptido al grupo tosilo, mientras que se usa un pH más básico para unir grupos amino de un polipéptido al grupo tosilo. En casos particulares divulgados en el presente documento, una molécula de unión polipeptídica (por ejemplo, un antígeno o anticuerpo) se une covalentemente a una partícula (por ejemplo, una partícula de perla) en un grupo tosilo, un grupo epoxi o un grupo clorometilo expuestos en la superficie de la partícula. En casos particulares divulgados en el presente documento, la molécula de unión polipeptídica está unida a una partícula tosilada (es decir, una partícula que comprende grupos tosilo expuestos en la superficie).

En algunos casos divulgados en el presente documento, un enlace no covalente entre un ligando unido al péptido o proteína antigénica y un antiligando unido al portador puede conjugar el antígeno con el portador. En algunos casos divulgados en el presente documento, una etiqueta de secuencia de reconocimiento de biotina ligasa puede unirse al extremo C de un péptido o proteína antigénica, y esta etiqueta puede biotinilarse por la biotina ligasa. La biotina puede servir entonces como ligando para conjugar de forma no covalente el péptido o proteína antigénica con avidina o estreptavidina que se adsorbe o se une de otro modo a la superficie del portador como un antiligando. Como alternativa, si los péptidos y proteínas antigénicas se fusionan a un dominio de inmunoglobulina que tiene una región Fc, como se ha descrito anteriormente, el dominio Fc puede actuar como un ligando, y la proteína A, ya sea unida de manera covalente o no covalente a la superficie del portador, puede servir como el antiligando para conjugar no covalentemente el péptido o proteína antigénica con el portador. En la técnica se conocen bien otros medios que pueden emplearse para conjugar de forma no covalente péptidos y proteínas antigénicas con portadores, incluyendo las técnicas de quelación de iones metálicos (por ejemplo, usando una etiqueta poli-His en el extremo C del péptido o proteína antigénica o proteínas de fusión de péptidos o proteínas antigénicas, y un portador recubierto de Ni), y estos métodos pueden sustituir a los descritos aquí.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión se conjuga con la partícula mediante un enlazador. En determinados casos divulgados en el presente documento, los enlazadores pueden incluir, pero sin limitación, una diversidad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de bis-activo fluorina (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Los agentes de acoplamiento particulares incluyen 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP) y 4-(2-piridilditio)pentanoato de N-succinimidilo (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro.

2. Unión reversible

En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión está unida de manera reversible o asociada de otro modo con una partícula, por ejemplo, una partícula de perla. En determinado caso divulgado en el presente documento, la molécula de unión está unida de manera reversible o asociada de otro modo con un reactivo que está unido a la partícula. En casos particulares divulgados en el presente documento, el reactivo está expuesto en la superficie de la partícula. En determinados casos divulgados en el presente documento, el reactivo contiene una pluralidad de sitios de unión capaces de unirse de manera reversible a la molécula de unión. En algunos casos divulgados en el presente documento, el reactivo es un reactivo de multimerización. En algunos casos divulgados en el presente documento, la interacción de unión entre la molécula de unión y el reactivo es una interacción no covalente. En algunos casos divulgados en el presente documento, la interacción de unión entre la molécula de unión y el reactivo, por ejemplo, por ejemplo, una interacción de unión no covalente, es reversible. En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión está unida de manera reversible a una partícula que es un oligómero o un polímero compuesto por proteínas, por ejemplo, estreptavidina.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la asociación reversible entre la molécula de unión y el reactivo puede medirse en presencia de una sustancia, tal como un reactivo de competición (también denominado reactivo eluyente), que es o contiene un sitio de unión que también es capaz de unirse al mismo sitio (o sitios) de unión del reactivo al que está unido la molécula de unión. Generalmente, la sustancia (por ejemplo, el reactivo de competición) puede actuar como competidor debido a una mayor afinidad de unión por el sitio de unión presente en el reactivo y/o debido a que está presente en concentraciones más altas que la molécula de unión, separando y/o disociando de este modo la molécula de unión del reactivo. En algunos casos divulgados en el presente documento, la afinidad de la sustancia (por ejemplo, reactivo de competición) por el al menos un sitio de unión en el reactivo es mayor que la afinidad de la molécula de unión por el al menos un sitio de unión en el reactivo. Por lo tanto, en algunos casos divulgados en el presente documento, el enlace entre la unión del reactivo y la molécula de unión se puede interrumpir mediante la adición de la sustancia (por ejemplo, reactivo de competición), haciendo así que la asociación del agente (por ejemplo, agente de unión al receptor o agente de selección) y el reactivo sea reversible.

Los reactivos que se pueden usar en dichos sistemas reversibles se describen y se conocen en la técnica, véanse, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. N.º 5.168.049; 5.506.121; 6.103.493; 7.776.562; 7.981.632; 8.298.782; 8.735.540; 9.023.604; y las sol. PCT internacionales publicadas N.º WO2013/124474 y WO2014/076277. A continuación se describen ejemplos no limitantes de reactivos y compañeros de unión capaces de formar una interacción reversible, así como sustancias (por ejemplo, reactivos de competición) capaces de revertir dicha unión.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el reactivo está unido y expuesto a la superficie de una partícula, por ejemplo, una partícula de perla, y contiene una pluralidad de sitios de unión que pueden unirse específicamente a la molécula de unión, de modo que el reactivo es capaz de unirse de manera reversible a una pluralidad de moléculas de unión, por ejemplo, es un reactivo de multimerización. En algunos casos divulgados en el presente documento, el reactivo es un oligómero o polímero de moléculas individuales (por ejemplo, monómeros) o complejos que constituyen una molécula individual (por ejemplo, tetrámero) que están unidos a la superficie de una partícula, cada uno de las cuales contiene al menos un sitio de unión capaz de unirse a la molécula de unión. En algunos casos divulgados en el presente documento, la partícula está compuesta por el reactivo, es decir, la partícula es un oligómero o un polímero del reactivo.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el reactivo es una estreptavidina, una muteína de estreptavidina o análogo, avidina, una muteína de avidina o análogo (tal como neutravidina) o una mezcla de las mismas, en las que dicho reactivo contiene uno o más sitios de unión capaces de una asociación reversible con una molécula de unión. En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión comprende una biotina, un derivado o análogo de biotina, o un péptido de unión a estreptavidina u otra molécula que es capaz de unirse específicamente al reactivo. En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión comprende una biotina, un derivado o análogo de biotina, o un péptido de unión a estreptavidina u otra molécula que es capaz de unirse específicamente a estreptavidina, una muteína de estreptavidina o análogo, avidina o una muteína de avidina o análogo. En determinados casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión es un polipéptido, por ejemplo, un antígeno polipeptídico o anticuerpo, que comprende un dominio de fusión que es una biotina, un derivado o análogo de biotina, o un péptido de unión a estreptavidina u otra molécula que es capaz de unirse específicamente a estreptavidina, una muteína de estreptavidina o análogo, avidina o una muteína de avidina o análogo. En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión es un polipéptido que comprende un dominio de fusión que es una biotina, un derivado o análogo de biotina, o un péptido de unión a estreptavidina u otra molécula que es capaz de unirse específicamente a estreptavidina, una muteína de estreptavidina o análogo, avidina o una muteína de avidina o análogo, y el reactivo es o comprende estreptavidina, avidina, un análogo o muteína de estreptavidina, o un análogo o muteína o avidina que se une de manera reversible a biotina, un análogo de biotina o un fragmento biológicamente activo de los mismos. En determinados casos divulgados en el presente documento, el dominio de fusión está ubicado en el extremo C de la molécula de unión. En algunos casos divulgados en el presente documento, el reactivo es o comprende un análogo o muteína de estreptavidina o un análogo o muteína de avidina que se une de manera reversible a un péptido de unión a estreptavidina. En algunos casos divulgados en el presente documento, la sustancia (por ejemplo, reactivo competitivo) puede ser una biotina, un derivado o análogo de biotina o un péptido de unión a estreptavidina capaz de competir por la unión con la molécula de unión por uno o más sitios de unión del reactivo. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio de fusión de la molécula de unión y la sustancia (por ejemplo, reactivo competitivo) son diferentes, y la sustancia (por ejemplo, reactivo competitivo) exhibe una afinidad de unión más alta por el reactivo en comparación con la afinidad de la molécula de unión por el reactivo. En determinados casos divulgados en el presente documento, el dominio de fusión y la sustancia, por ejemplo, el reactivo competitivo, son los mismos.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la estreptavidina puede ser estreptavidina de tipo natural, muteínas de estreptavidina o análogos, tales como polipéptidos similares a estreptavidina. Asimismo, la avidina, en algunos casos divulgados en el presente documento, incluye avidina de tipo natural o muteínas o análogos de avidina tales como neutravidina, una avidina desglucosilada con argininas modificadas que típicamente presenta un punto isoelectrónico más neutro y está disponible como una alternativa a la avidina natural. Generalmente, las formas desglucosiladas y neutras de avidina incluyen las formas disponibles comercialmente tales como "Extravidin", disponible a través de Sigma Aldrich, o "NeutrAvidin" disponible a través de Thermo Scientific o Invitrogen, por ejemplo.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el reactivo es una estreptavidina o una muteína de estreptavidina o análogo. En algunos casos divulgados en el presente documento, la estreptavidina de tipo natural (estreptavidina wt) tiene la secuencia de aminoácidos divulgada por Argarana *et al.*, Nucleic Acids Res. 14 (1986) 1871-1882 (SEQ ID NO: 21). En general, la estreptavidina se presenta de forma natural como un tetrámero de cuatro subunidades idénticas, es decir, es un homotetrámero, donde cada subunidad contiene un único sitio de unión para la biotina, un derivado o análogo de biotina o un imitador de biotina. Una secuencia de ejemplo de una subunidad de estreptavidina es la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 21, pero tal secuencia también puede incluir una secuencia presente en homólogos de la misma de otras especies de *Streptomyces*. En particular, cada subunidad de estreptavidina puede exhibir una fuerte afinidad de unión por la biotina con una constante de disociación de equilibrio (K_D) del orden de aproximadamente 10^{-14} M. En algunos casos, la estreptavidina puede existir como un tetrámero monovalente en el que solo uno de los cuatro sitios de unión es funcional (Howarth *et al.* (2006) Nat. Methods, 3:267-73; Zhang *et al.* (2015) Biochem. Biophys. Res. Commun., 463:1059-63)), un tetrámero divalente en el que dos de los cuatro sitios de unión son funcionales (Fairhead *et al.* (2013) J. Mol. Biol., 426:199-214), o puede estar presente en forma monomérica o dimérica (Wu *et al.* (2005) J. Biol. Chem., 280:23225-31; Lim *et al.* (2010) Biochemistry, 50:8682-91).

En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión comprende un dominio de fusión que es una etiqueta de estrep., por ejemplo, tal como se divulga en la Pat. de EE. UU. N.º 5.506.121, que es una secuencia peptídica que actúa como imitadores de biotina y demuestra una afinidad de unión por la estreptavidina. En algunos casos, la afinidad de unión se puede mejorar aún más haciendo una mutación dentro de la molécula de estreptavidina, véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. N.º 6.103.493 o la solicitud PCT internacional publicada N.º WO2014/076277. En algunos casos divulgados en el presente documento, la afinidad de unión se puede determinar mediante métodos conocidos en la técnica.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el reactivo, tal como una estreptavidina o muteína de estreptavidina, exhibe afinidad de unión por un dominio de fusión de la molécula de unión. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio de fusión comprende una secuencia peptídica que contiene una secuencia con la fórmula general expuesta en SEQ ID NO: 11, tal como contiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 12. En algunos casos divulgados en el presente documento, la secuencia peptídica tiene la fórmula general expuesta en la SEQ ID NO: 13, tal como se expone en SEQ ID NO: 43. En un caso divulgado en el presente documento, la secuencia peptídica se expone en la SEQ ID NO: 9. En un caso divulgado en el presente documento, la secuencia peptídica se expone en la SEQ ID NO: 10, también conocida como polipéptido de estreptavidina STREP-TAG® II. En algunos casos divulgados en el presente documento, el ligando peptídico contiene una disposición secuencial de al menos dos módulos de unión a estreptavidina, en donde la distancia entre los dos módulos es de al menos 0 y no superior a 50 aminoácidos, en donde un módulo de unión tiene de 3 a 8 aminoácidos y contiene al menos la secuencia His-Pro-Xaa (SEQ ID NO: 11), donde Xaa es glutamina, asparagina o metionina, y en donde el otro módulo de unión tiene el mismo o diferente ligando peptídico de estreptavidina, tal como se establece en la SEQ ID NO: 13 (véase, por ejemplo, la Sol. PCT internacional publicada N.º WO02/077018; la Patente de EE. UU. N.º 7.981.632). En algunos casos divulgados en el presente documento, el ligando peptídico contiene una secuencia que tiene la fórmula expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 15 o 16. En algunos casos divulgados en el presente documento, el ligando peptídico tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 15-22.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el reactivo es una estreptavidina o muteína de estreptavidina (o una porción de la misma) que se une a o reconoce a otros ligandos de estreptavidina, tales como, pero sin limitación, biotina, iminobiotina, ácido lipoico, destiobiotina, diaminobiotina, HABA (ácido hidroxiazobenceno-benzoico) y/o dimetil-HABA. En algunos casos divulgados en el presente documento, las muteínas de estreptavidina presentan una afinidad de unión por otro ligando de estreptavidina, tal como biotina o destiobiotina, que es mayor que la afinidad de unión de la muteína de estreptavidina por un ligando peptídico imitador de biotina, tal como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO: 7-19. Por lo tanto, en algunos casos divulgados en el presente documento, se puede emplear biotina o un análogo o derivado de biotina (por ejemplo, destiobiotina) como reactivo de competencia en los métodos divulgados. Por ejemplo, como ejemplo, la interacción de una muteína de estreptavidina denominada Strep-tactin® (por ejemplo, que contiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 23).

En algunos casos divulgados en el presente documento, el reactivo comprende al menos dos grupos quelantes K que pueden ser capaces de unirse a un ion de metal de transición. En algunos casos divulgados en el presente documento, el reactivo puede ser capaz de unirse a una etiqueta de afinidad de oligohistidina, una glutatión-S-transferasa, calmodulina o un análogo de la misma, péptido de unión a calmodulina (CBP), un péptido FLAG, una etiqueta HA, proteína de unión a maltosa (MBP), un epítipo HSV, un epítipo myc y/o una proteína portadora biotinilada.

3. Orientación de la molécula de unión

En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión está unida o adherida a la partícula, por ejemplo, una partícula de perla, en una orientación que está optimizada para permitir una interacción entre la molécula de unión y una célula que expresa un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR, que está unido por o es reconocido por la molécula de unión. En algunos casos divulgados en el presente documento, la orientación optimizada permite la unión entre la molécula de unión y el receptor recombinante con una interferencia mínima o nula por parte de la

partícula a la que está unida la molécula de unión. En algunos casos divulgados en el presente documento, la posición relativa de la partícula con respecto a la región de la molécula de unión que se une o reconoce el CAR, por ejemplo, el antígeno o anti ID, no impide el acceso de esta región para que entre en contacto con células que expresan el receptor recombinante, por ejemplo, el CAR. En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión está unida a la partícula en una región diferente, por ejemplo, un dominio de fusión, que la región que se une o reconoce el receptor recombinante de la célula diana, por ejemplo, el antígeno o anti ID. En determinados casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión no está unida a la partícula en la región que se une a o reconoce el receptor recombinante. En determinados casos divulgados en el presente documento, es menos probable que la molécula de unión se una a la partícula en la región que se une a o reconoce el receptor recombinante en comparación con otra región de la molécula de unión.

Los casos particulares divulgados en el presente documento contemplan que cuando una molécula de unión se une a una partícula, por ejemplo, una partícula de perla, en un extremo de la molécula de unión, por ejemplo, en el extremo C, esto proporciona una orientación óptima para que la molécula de unión se una al receptor recombinante. En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión se une a la partícula en el extremo opuesto de la región que se une o reconoce al receptor recombinante. En determinados casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión se une a la partícula de modo que la región que se une al receptor recombinante, por ejemplo, el antígeno o anti ID, se posiciona lejos de la partícula. En casos particulares divulgados en el presente documento, la molécula de unión está unida a la partícula en un extremo, por ejemplo, en su extremo C, y la región que se une al receptor recombinante está en el extremo opuesto, por ejemplo, el extremo N, de la molécula de unión. En casos particulares divulgados en el presente documento, la molécula de unión está unida a la partícula de modo que el antígeno o anti ID de la molécula de unión se posiciona en una orientación hacia afuera en relación con la partícula. Algunos casos divulgados en el presente documento contemplan que la orientación hacia afuera para la región que se une al receptor recombinante de la partícula proporciona la mayor probabilidad de interacciones entre las moléculas de unión y las células que expresan un receptor recombinante.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión, por ejemplo, un polipéptido, comprende una región que se une a o reconoce el receptor recombinante de la célula diana, por ejemplo, un antígeno o anti ID, y está adherida o unida a la partícula en una región separada, por ejemplo, un dominio de fusión. En determinados casos divulgados en el presente documento, la región que se une a o reconoce el receptor recombinante y la región separada, por ejemplo, el dominio de fusión, están en extremos opuestos de la molécula de unión. En determinados casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión comprende una región que se une a o reconoce el receptor recombinante de la célula diana que está en o cerca del extremo N de la molécula de unión y una región separada, por ejemplo, un dominio de fusión, que está en o cerca del dominio en el extremo C. En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión comprende una región que se une a o reconoce el receptor recombinante de la célula diana que está en o cerca del extremo C de la molécula de unión y la región separada, por ejemplo, un dominio de fusión, que está en o cerca del dominio en el extremo N. En algunos casos divulgados en el presente documento, una región de una molécula de unión, por ejemplo, un antígeno polipeptídico o anticuerpo, está cerca del extremo N o del extremo C si la región está ubicada dentro de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, quince, veinte, veinticinco, treinta, treinta y cinco, cuarenta, cuarenta y cinco, cincuenta, sesenta, setenta, ochenta, noventa o cien aminoácidos desde el extremo N o el extremo C.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión es un polipéptido, por ejemplo, un antígeno polipeptídico o anticuerpo, que comprende un dominio de fusión que se une a la partícula. En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión se une a la partícula en uno o más sitios dentro del dominio de fusión. En determinados casos divulgados en el presente documento, es más probable que la molécula de unión se una a la partícula en uno o más sitios dentro del dominio de fusión que en uno o más sitios de la molécula de unión que quedan fuera del dominio de fusión. En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión tiene 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 99 %, al menos un 99,9 % o al menos un 100 % más de probabilidades de unirse a la partícula en uno o más sitios dentro del dominio de fusión que en uno o más sitios de la molécula de unión que quedan fuera del dominio de fusión. En determinados casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión tiene al menos 1 vez, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 40 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 500 veces o al menos 1000 veces más probabilidades de unirse a la partícula en uno o más sitios dentro del dominio de fusión que en uno o más sitios de la molécula de unión que quedan fuera del dominio de fusión.

En determinados casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión está unida a un dominio de fusión o etiqueta. En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión es o contiene un antígeno o un anti ID que es reconocido y/o está unido por un receptor recombinante, tal como un receptor de antígeno o un CAR, que está unida, directa o indirectamente, a un dominio de fusión o etiqueta. En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión es un polipéptido de fusión que contiene el antígeno o una porción del mismo y un dominio de fusión o etiqueta. En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión está

conjugada con la partícula en un sitio (por ejemplo, una cadena lateral de un aminoácido) en o dentro del dominio de fusión o etiqueta. En determinados casos divulgados en el presente documento, la unión de la molécula de unión a la partícula en el dominio de fusión o etiqueta da como resultado una orientación óptima para que la molécula de unión que está conjugada con la partícula se una o sea reconocida por el receptor recombinante o CAR. En algunos casos divulgados en el presente documento, una molécula de unión que comprende un antígeno o anti ID que es reconocido por un receptor de antígeno, por ejemplo, CAR, está unida a un dominio de fusión o etiqueta en el extremo C, en cuyo caso, la conjugación con la partícula a través del dominio de fusión o etiqueta orienta o expone preferentemente la región en el extremo N de la molécula de unión unida para las interacciones con el receptor de antígeno, por ejemplo, CAR.

Los dominios de fusión o etiquetas se conocen bien en la técnica, y pueden estar unidos a un antígeno en las moléculas de unión divulgadas para conferir una propiedad deseada, por ejemplo, aislamiento del polipéptido de fusión mediante cromatografía de afinidad, o unión covalente a un grupo funcional en una superficie de la partícula. Los ejemplos bien conocidos de dichos dominios de fusión incluyen, pero sin limitación, polihistidina, Glu-Glu, avidina, glutatión S transferasa (GST), tiorredoxina, proteína A, proteína G, una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (Fc), proteína de unión a maltosa (MBP) o seroalbúmina humana. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio de fusión es una etiqueta polipeptídica. Los ejemplos bien conocidos de etiquetas polipeptídicas incluyen, pero sin limitación, AviTag (SEQ ID NO: 3), una etiqueta de calmodulina (SEQ ID NO: 4), una etiqueta de poliglutamato (SEQ ID NO: 5), una etiqueta FLAG (SEQ ID NO: 6), una etiqueta HA (SEQ ID NO: 7), una etiqueta His (5-10 histidinas), una etiqueta Myc (SEQ ID NO: 8) y etiquetas de proteína fluorescente (por ejemplo, EGFP).

En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio de fusión o etiqueta comprende una secuencia peptídica de unión a estreptavidina. En algunos casos divulgados en el presente documento, la secuencia es una secuencia peptídica de unión a estreptavidina STREP-TAG® como se ilustra por las SEQ ID NO: 9 y 10. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio de fusión comprende una secuencia peptídica de unión a estreptavidina como se ilustra por las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 11-19.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión comprende un dominio de fusión GST que se une a un glutatión expuesto en la superficie de la partícula. En casos particulares divulgados en el presente documento, el dominio de fusión GST se encuentra en o cerca del extremo C de la molécula de unión. En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión comprende un dominio de fusión de etiqueta de estrep., que se une a un ligando de biotina o estreptavidina expuesto en la superficie de la partícula. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio de fusión de etiqueta de estrep. se encuentra en o cerca del extremo C de la molécula de unión. En casos particulares divulgados en el presente documento, la molécula de unión comprende un dominio de fusión de proteína A que se une a un polipéptido Fc unido a la superficie de la partícula. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio de fusión de proteína A se encuentra en o cerca del extremo C de la molécula de unión. En determinados casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión comprende un dominio de fusión de proteína G que se une a una albúmina o a un polipéptido Fc unido a la superficie de la partícula. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio de fusión de proteína A se encuentra en o cerca del extremo C de la molécula de unión.

En casos particulares divulgados en el presente documento, la molécula de unión contiene una región hidrófoba o una región que es más hidrófoba que el resto de la molécula de unión. En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión comprende una región que es más hidrófoba que los sitios de la molécula de unión que quedan fuera de la región hidrófoba. En algunos casos divulgados en el presente documento, la región hidrófoba es un dominio de fusión. En casos particulares divulgados en el presente documento, la región hidrófoba es un dominio Fc. En determinados casos divulgados en el presente documento, es más probable que la molécula de unión se una o adhiera a la partícula en uno o más sitios en una región hidrófoba que en una región diferente de la molécula de unión si la superficie de la partícula es hidrófoba. En diversos casos divulgados en el presente documento, la región hidrófoba de la molécula de unión se une a un grupo funcional expuesto en la superficie de la partícula. En algunos casos divulgados en el presente documento, el grupo funcional es o contiene un grupo tosilo.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión comprende un dominio Fc, en donde el dominio Fc está presente en el extremo C del polipéptido de fusión. En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión es un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo antiidiotipo, que comprende un dominio Fc. En casos particulares divulgados en el presente documento, el dominio Fc se une o se adhiere a una proteína G o proteína A expuesta en la superficie de la partícula. En algunos casos divulgados en el presente documento, uno o más grupos funcionales de uno o más aminoácidos presentes en el dominio Fc se unen a un grupo funcional de la partícula. En casos particulares divulgados en el presente documento, el dominio Fc del polipéptido de fusión o anticuerpo es más hidrófobo que la región de antígeno o anticuerpo de la molécula de unión, y los sitios dentro del dominio Fc tienen más probabilidades de unirse a una partícula, por ejemplo, en grupos funcionales expuestos en la superficie, cuando la superficie de la partícula es hidrófoba, que los sitios de la molécula de unión que están fuera del dominio Fc.

En casos particulares divulgados en el presente documento, una molécula de unión que comprende un dominio Fc está unida a una partícula en uno o más sitios dentro de la región Fc. La unión de una molécula de unión en un sitio

ubicado en la región Fc a una partícula, por ejemplo, una partícula de perla, puede realizarse fácilmente a través de técnicas estándar en la técnica. Por ejemplo, los dominios Fc tienden a ser hidrófobos, y cuando el dominio Fc es más hidrófobo que los otros dominios de la molécula de unión (por ejemplo, el antígeno polipeptídico), entonces la unión entre las cadenas laterales de aminoácidos ubicadas dentro del dominio Fc y los grupos funcionales expuestos en la superficie ubicados en la partícula (por ejemplo, grupos tosilo) puede tener lugar si la superficie de la partícula es hidrófoba. En algunos casos divulgados en el presente documento, la superficie de la partícula es hidrófoba. En algunos casos divulgados en el presente documento, la superficie de la partícula no es hidrófila. En casos particulares divulgados en el presente documento, la superficie de la partícula es hidrófoba y comprende grupos tosilo expuestos en la superficie.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la partícula no es hidrófoba. En determinados casos divulgados en el presente documento, la partícula es hidrófila. En algunos casos divulgados en el presente documento, la superficie de la partícula no es hidrófoba. En algunos casos divulgados en el presente documento, la superficie de la partícula es hidrófila.

4. Partículas conjugadas

En algunos casos divulgados en el presente documento, una molécula de unión (por ejemplo, un antígeno polipeptídico o anticuerpo) está unida a una partícula, por ejemplo, una partícula de perla. En determinados casos divulgados en el presente documento, el polipéptido está unido covalentemente a la partícula. En algunos casos divulgados en el presente documento, el polipéptido está unido no covalentemente a la partícula. En algunos casos divulgados en el presente documento, al menos 1 molécula de unión, al menos 10 moléculas de unión, al menos 10^2 moléculas de unión, al menos 10^3 moléculas de unión, al menos 10^4 moléculas de unión, al menos 10^5 moléculas de unión, al menos 10^6 moléculas de unión, al menos 10^7 moléculas de unión, al menos 10^8 moléculas de unión o al menos 10^9 moléculas de unión están unidas a cada partícula. En casos particulares divulgados en el presente documento, entre o entre aproximadamente 10^2 moléculas de unión y 10^9 moléculas de unión, 10^2 moléculas de unión y 10^7 moléculas de unión, 10^3 moléculas de unión y 10^9 moléculas de unión, 10^3 moléculas de unión y 10^8 moléculas de unión o 10^3 moléculas de unión y 10^6 moléculas de unión están unidas covalentemente a cada partícula, cada uno inclusive. En casos particulares divulgados en el presente documento, entre o entre aproximadamente 10^3 moléculas de unión y 10^6 moléculas de unión, inclusive, están unidas covalentemente a cada partícula. En casos particulares divulgados en el presente documento, entre o entre aproximadamente 10^4 moléculas de unión y 10^6 moléculas de unión, inclusive, están unidas covalentemente a cada partícula. En determinados casos divulgados en el presente documento, entre o entre aproximadamente 10^4 moléculas de unión y 10^5 moléculas de unión están unidas covalentemente a cada partícula. En algunos casos divulgados en el presente documento, entre aproximadamente 10^5 moléculas de unión y 10^6 moléculas de unión, inclusive están unidas covalentemente a cada partícula.

En determinados casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión está unida covalentemente a la partícula, por ejemplo, una partícula de perla. En casos particulares divulgados en el presente documento, una cantidad de al menos 0,001 μg , al menos 0,01 μg , al menos 0,1 μg , al menos 0,5 μg , al menos 1 μg , al menos 1,5 μg , al menos 2 μg , al menos 2,5 μg , al menos 3 μg , al menos 3,5 μg , al menos 4 μg , al menos 4,5 μg , al menos 5 μg , al menos 6 μg , al menos 7 μg , al menos 8 μg , al menos 9 μg , al menos 10 μg , o al menos 50 μg de las moléculas de unión polipeptídicas está unida covalentemente a las partículas, por ejemplo, perlas, por cada 10^7 partículas. En algunos casos divulgados en el presente documento, entre o entre aproximadamente 0,001 μg y 100 μg , 0,01 μg y 50 μg , 0,1 μg y 10 μg , 0,5 μg y 10 μg , 0,1 μg y 1 μg , 1 μg y 10 μg , 0,5 μg y 5 μg , o 1 μg y 5 μg , cada uno inclusive, de las moléculas de unión polipeptídicas están unidos covalentemente a las partículas, por ejemplo, perlas, por cada 10^7 partículas. En casos particulares divulgados en el presente documento, entre o entre aproximadamente 1 μg y aproximadamente 10 μg , inclusive, de las moléculas de unión polipeptídicas están unidos covalentemente a las partículas, por ejemplo, perlas, por cada 10^7 partículas.

En determinados casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión está unida o adherida a la partícula, por ejemplo, una partícula de perla. En casos particulares divulgados en el presente documento, una cantidad promedio de, de aproximadamente, o de al menos 0,0001 pg, 0,001 pg, 0,005 pg, 0,01 pg, 0,02 pg, 0,03 pg, 0,04 pg, 0,05 pg, 0,06 pg, 0,07 pg, 0,08 pg, 0,09 pg, 0,1 pg, 0,2 pg, 0,3 pg, 0,4 pg, 0,5 pg, 0,6 pg, 0,7 pg, 0,8 pg, 0,9 pg, 1,0 pg o 5,0 pg de las moléculas de unión polipeptídicas está unida o adherida a cada partícula. En algunos casos divulgados en el presente documento, entre o entre aproximadamente 0,0001 pg y aproximadamente 10 pg, 0,001 pg y 1 pg, 0,001 pg y 1 pg, 0,001 μg y 0,1 pg, 0,01 pg y 0,1 pg, 1 pg y 10 pg, 0,5 pg y 5 pg, o b 1 pg y 5 pg, cada uno inclusive, de las moléculas de unión están unidos o adheridos a la partícula. En casos particulares divulgados en el presente documento, una cantidad promedio de igual a o inferior a 0,0001 pg, 0,001 pg, 0,005 pg, 0,01 pg, 0,02 pg, 0,03 pg, 0,04 pg, 0,05 pg, 0,06 pg, 0,07 pg, 0,08 pg, 0,09 pg, 0,1 pg, 0,2 pg, 0,3 pg, 0,4 pg, 0,5 pg, 0,6 pg, 0,7 pg, 0,8 pg, 0,9 pg, 1,0 pg o 5,0 pg de las moléculas de unión polipeptídicas está unida o adherida a cada partícula. En casos particulares divulgados en el presente documento, la partícula tiene un diámetro de aproximadamente 2,8 μm y entre o entre aproximadamente 0,001 y 0,1 pg, inclusive, de las moléculas de unión están unidos o adheridos a la partícula. En casos particulares divulgados en el presente documento, la partícula tiene un diámetro de aproximadamente 4,5 μm y entre o entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 1 pg, inclusive, de las moléculas de unión están unidos o adheridos a la partícula.

En casos particulares divulgados en el presente documento, la molécula de unión está unida o adherida a la partícula, por ejemplo, una partícula de perla, en una cantidad de al menos 10^{-16} mol, al menos 10^{-15} mol, al menos 10^{-14} mol, al menos 10^{-13} mol, al menos 10^{-12} mol, al menos 10^{-11} mol, al menos 10^{-10} mol, al menos 10^{-9} mol, al menos 10^{-8} mol, al menos 10^{-7} mol, al menos 10^{-6} mol, al menos 10^{-5} mol, al menos 10^{-4} mol, al menos 10^{-3} mol, al menos 10^{-2} mol, al menos 10^{-1} mol o al menos 1 mol por cada 10^7 partículas. En algunos casos divulgados en el presente documento, entre o entre aproximadamente 1×10^{-13} mol y 1×10^{-9} mol, 1×10^{-12} mol y 1×10^{-9} mol, 1×10^{-13} mol y 1×10^{-10} mol, o 1×10^{-12} mol y 1×10^{-9} mol, cada uno inclusive, están unidos o adheridos a las partículas por cada 10^7 partículas.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión está unida o adherida a la partícula, por ejemplo, una partícula de perla, en una cantidad de al menos 10^{-20} mol, al menos 10^{-19} mol, al menos 10^{-18} mol, al menos 10^{-17} mol, al menos 10^{-16} mol, al menos 10^{-15} mol, al menos 10^{-14} mol, al menos 10^{-13} mol, al menos 10^{-12} mol, al menos 10^{-11} mol o al menos 10^{-10} mol a cada partícula. En algunos casos divulgados en el presente documento, entre o entre aproximadamente 10^{-21} mol y 10^{-10} mol, 10^{-20} mol y 10^{-18} mol, 10^{-19} mol y 10^{-17} mol, o 10^{-21} mol y 10^{-19} mol, cada uno inclusive, están unidos covalentemente a las partículas, por ejemplo, perlas, por cada partícula. En algunos casos divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, tienen un diámetro de aproximadamente 2,8 μm y la molécula de unión está unida o adherida a la partícula en una cantidad de entre o entre aproximadamente 10^{-20} mol y 10^{-18} mol, inclusive. En determinados casos divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, tienen un diámetro de aproximadamente 4,5 μm y la molécula de unión está unida o adherida a la partícula en una cantidad de entre o entre aproximadamente 10^{-19} mol y 10^{-17} mol, inclusive.

En determinados casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión se incuba con partículas, por ejemplo, perlas, por ejemplo, perlas activadas con tosilo, para unir y/o conjugar las moléculas de unión con las partículas, por ejemplo, perlas. En casos particulares divulgados en el presente documento, las moléculas de unión y las partículas, por ejemplo, perlas, se incuban a una concentración o de aproximadamente 1 μg , 2 μg , 2,5 μg , 5 μg , 10 μg , 20 μg , 25 μg , 30 μg , 40 μg , 50 μg , 60 μg , 70 μg , 75 μg , 100 μg , 125 μg , 150 μg , 175 μg o 200 μg de moléculas de unión por entre 1×10^8 y 1×10^{10} partículas, inclusive, y las moléculas de unión están unidas y/o conjugadas con las partículas, por ejemplo, perlas, con una eficacia de o de aproximadamente o superior al 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,9 % o de o de aproximadamente el 100 %. En algunos casos divulgados en el presente documento, las moléculas de unión y las partículas, por ejemplo, perlas, se incuban a una concentración o de aproximadamente 1 μg , 2 μg , 2,5 μg , 5 μg , 10 μg , 20 μg , 25 μg , 30 μg , 40 μg , 50 μg , 60 μg , 70 μg , 75 μg , 100 μg , 125 μg , 150 μg , 175 μg o 200 μg de moléculas de unión por entre 4×10^8 y 5×10^8 partículas, inclusive, y las moléculas de unión están unidas y/o conjugadas con las partículas, por ejemplo, perlas, con una eficacia de o de aproximadamente o superior al 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,9 % o de o de aproximadamente el 100 %. En casos particulares divulgados en el presente documento, las moléculas de unión y las partículas, por ejemplo, perlas, se incuban a una concentración o de aproximadamente 1 μg , 2 μg , 2,5 μg , 5 μg , 10 μg , 20 μg , 25 μg , 30 μg , 40 μg , 50 μg , 60 μg , 70 μg , 75 μg , 100 μg , 125 μg , 150 μg , 175 μg o 200 μg de moléculas de unión por entre $3,5 \times 10^9$ y $4,5 \times 10^9$ partículas, inclusive, y las moléculas de unión se unen y/o se conjugan con las partículas con una eficacia de o de aproximadamente o superior al 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,9 % o de o de aproximadamente el 100 %. En casos particulares divulgados en el presente documento, entre 1 μg y 5 μg , entre 5 μg y 25 μg , entre 1 μg y 50 μg , entre 10 μg y 50 μg , 0,1 μg y 10 μg , o 50 μg y 200 μg , cada uno inclusive, de la molécula de unión se incuban con entre o entre aproximadamente 4×10^8 y 5×10^8 partículas o entre $3,5 \times 10^9$ y $4,5 \times 10^9$ partículas, cada uno inclusive, y las moléculas de unión están unidas y/o conjugadas con las partículas, por ejemplo, perlas, con una eficacia de o de aproximadamente o superior al 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,9 % o de o de aproximadamente el 100 %.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la cantidad promedio de molécula de unión conjugada o unida a la partícula es, es aproximadamente o es de al menos 2×10^{-16} g/partícula, 1×10^{-15} g/partícula, 2×10^{-15} g/partícula, 5×10^{-15} g/partícula, 1×10^{-14} g/partícula, 2×10^{-14} g/partícula, 5×10^{-14} g/partícula, 1×10^{-13} g/partícula, 2×10^{-13} g/partícula, 5×10^{-13} g/partícula, 1×10^{-13} g/partícula y 2×10^{-13} g/partícula ± 50 %, ± 40 %, ± 30 %, ± 25 %, ± 20 %, ± 10 %, ± 5 % o ± 1 %. En determinados casos divulgados en el presente documento, la cantidad promedio de molécula de unión conjugada o unida a la partícula es o es aproximadamente de 2×10^{-16} g/partícula ± 50 %, ± 40 %, ± 30 %, ± 25 %, ± 20 %, ± 10 %, ± 5 % o ± 1 %. En casos particulares divulgados en el presente documento, la cantidad promedio de molécula de unión conjugada o unida a la partícula es o es aproximadamente de 1×10^{-15} g/partícula ± 50 %, ± 40 %, ± 30 %, ± 25 %, ± 20 %, ± 10 %, ± 5 % o ± 1 %. En determinados casos divulgados en el presente documento, la cantidad promedio de molécula de unión conjugada o unida a la partícula es o es aproximadamente de 2×10^{-15} g/partícula ± 50 %, ± 40 %, ± 30 %, ± 25 %, ± 20 %, ± 10 %, ± 5 % o ± 1 %. En casos particulares divulgados en el presente documento, la cantidad promedio de molécula de unión conjugada o unida a la partícula es o es aproximadamente de 1×10^{-14} g/partícula ± 50 %, ± 40 %, ± 30 %, ± 25 %, ± 20 %, ± 10 %, ± 5 % o ± 1 %. En determinados casos divulgados en el presente documento, la cantidad promedio de molécula de unión conjugada o unida a la partícula es igual o inferior a 5×10^{-13} g/partícula, 2×10^{-13} g/partícula, 1×10^{-13} g/partícula, 5×10^{-14} g/partícula, 2×10^{-14} g/partícula, 1×10^{-14} g/partícula, 5×10^{-15} g/partícula, 2×10^{-15} g/partícula, 1×10^{-15} g/partícula o 2×10^{-16} g/partícula.

En algunos casos divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, comprenden moléculas de unión que son anticuerpos antiidiotipo, o fragmentos activos de los mismos, que se unen al dominio de unión a antígeno de un CAR. En determinados casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo anti CAR antiidiotipo, o fragmento activo del mismo, está unido a un grupo tosilo expuesto en la superficie de la partícula en un sitio (por

ejemplo, un grupo amino de la cadena lateral o un grupo sulfhidrilo de un aminoácido) ubicado dentro del dominio Fc del anticuerpo. En casos particulares divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, son monodispersas y superparamagnéticas. En casos particulares divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, tienen un diámetro de aproximadamente 2,8 μm , entre aproximadamente 10^4 y aproximadamente 10^6 copias, inclusive, de la molécula de unión, es decir, un anticuerpo anti CAR antiidiotipo, por partícula. En algunos casos divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, tienen un diámetro de aproximadamente 4,5 μm , y comprenden aproximadamente entre aproximadamente 5×10^5 y aproximadamente 5×10^6 copias, inclusive, del anticuerpo anti CAR antiidiotipo por partícula.

En determinados casos divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, comprenden una molécula de unión que es o contiene antígeno polipeptídico BCMA. En casos particulares divulgados en el presente documento, la molécula de unión comprende un dominio extracelular de BCMA humano y un dominio Fc, que, en algunos casos, es un dominio Fc del extremo C. En casos particulares divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, tienen un diámetro de aproximadamente 280 μm , y comprenden aproximadamente 10^5 copias de la molécula de unión, por ejemplo, el polipéptido de fusión BCMA, por partícula. En determinados casos divulgados en el presente documento, el polipéptido de fusión BCMA está unido a un grupo tosilo expuesto en la superficie de la partícula en un sitio (por ejemplo, un grupo amino de cadena lateral o un grupo sulfhidrilo de un aminoácido) ubicado dentro del dominio Fc del polipéptido de fusión. En casos particulares divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, son monodispersas y superparamagnéticas. En casos particulares divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, tienen un diámetro de aproximadamente 2,8 μm , entre aproximadamente 10^4 y aproximadamente 10^6 copias, inclusive, de la molécula de unión, es decir, un polipéptido de fusión BCMA, por partícula. En algunos casos divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, tienen un diámetro de aproximadamente 4,5 μm , y comprenden entre o entre aproximadamente 5×10^5 y 5×10^6 copias, inclusive, del polipéptido de fusión BCMA por partícula.

II. ESTIMULACIÓN O EXPANSIÓN *EX VIVO* DE CÉLULAS

En el presente documento se divulga un método para estimular o expandir células que expresan un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR, que comprende incubar una composición de entrada que comprende células que expresan un CAR con partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden una molécula de unión que se une específicamente o reconoce el receptor recombinante, por ejemplo, reactivos conjugados con perlas como se divulga, tales como perlas conjugadas con anti ID o perlas conjugadas con BCMA. En algunos casos divulgados en el presente documento, la unión entre la molécula de unión y el receptor recombinante, por ejemplo, un CAR, induce la expansión de las células que expresan el CAR, produciendo de este modo una composición de salida que comprende células expandidas. En casos particulares divulgados en el presente documento, el receptor recombinante es un CAR. En determinados casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión es un anticuerpo antiidiotipo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une al fragmento de unión a antígeno del receptor recombinante. En determinados casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión es un antígeno que se une a o es reconocido por el CAR.

En algunos casos divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden una molécula de unión se ponen en contacto o se incuban con una composición de entrada que comprende una o más células para generar una composición de salida. En determinados casos divulgados en el presente documento, la composición de entrada o las células de entrada se refieren a una composición y/o una pluralidad de células que se desea tratar, incubar o poner en contacto en condiciones que estimularán, activarán, provocarán, generarán y/o producirán uno o más cambios en al menos una porción de las células de la composición de entrada, convirtiendo así la composición de entrada en una composición de salida. En algunos casos divulgados en el presente documento, las células de entrada son una composición de células inmunitarias, por ejemplo, una composición de linfocitos T que contienen células que expresan un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR. En casos particulares divulgados en el presente documento, al menos una porción de las células de la composición de entrada están activadas, expandidas y/o enriquecidas en la composición de salida generada mediante la puesta en práctica de los métodos divulgados.

En determinados casos divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden una molécula de unión se ponen en contacto o se incuban con células de una composición de entrada para generar una composición de salida mediante la expansión, el enriquecimiento y/o la activación de al menos una porción, por ejemplo, un subgrupo o una fracción, de las células de entrada. En casos particulares divulgados en el presente documento, las células de la composición de entrada comprenden al menos una porción de células que expresan un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR, y/o al menos una porción de células que contienen una molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica un receptor recombinante. En algunos casos divulgados en el presente documento, la composición de entrada comprende células que se van a tratar, poner en contacto o incubar con una partícula que comprende una molécula de unión, en donde el tratamiento, la puesta en contacto o la incubación con el agente alterarán al menos una porción de las células de la composición de entrada, generando de este modo una composición de salida. Tales alteraciones pueden incluir, pero sin limitación, expandir y/o enriquecer una porción de células, la activación de al menos una porción de las células y/o aumentar o disminuir la expresión de al menos un gen de al menos una porción de las células. En determinados casos divulgados en el presente documento, la composición de salida comprende al menos una porción de células de la composición de entrada que ha

experimentado una alteración después de la alteración por el tratamiento, la puesta contacto o la incubación con el agente.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la expansión, el enriquecimiento, la estimulación y/o la activación que se logran mediante la incubación de células con partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden una molécula de unión puede valorarse, ajustarse y/o controlarse seleccionando partículas, por ejemplo, perlas, con un número, nivel o cantidad particulares de moléculas de unión que están conjugadas o unidas de otro modo a cada partícula. En casos particulares divulgados en el presente documento, aumentar el número de moléculas de unión conjugadas o unidas de otro modo a cada partícula aumenta la expansión, el enriquecimiento, la estimulación y/o la activación que se logran incubando las células con las partículas, por ejemplo, perlas. En determinados casos divulgados en el presente documento, disminuir el número de moléculas de unión conjugadas o unidas de otro modo a cada partícula disminuye la expansión, el enriquecimiento, la estimulación y/o la activación que se logran incubando las células con las partículas, por ejemplo, perlas. En casos particulares divulgados en el presente documento, la expansión, el enriquecimiento, la estimulación y/o la activación se miden mediante cualquier medio conocido adecuado. En casos particulares divulgados en el presente documento, un aumento en la expansión, el enriquecimiento, la estimulación y/o la activación es un aumento estadísticamente significativo y/o un aumento de al menos o al menos aproximadamente un 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 1 vez, 2 veces, 3 veces, 5 veces, 10 veces, 100 veces, por ejemplo, en comparación con un control y/o incubación en diferentes condiciones, de una medición asociada con la expansión, el enriquecimiento, la estimulación y/o la activación tomada de las células durante o después de la incubación con las partículas, por ejemplo, perlas. En determinados casos divulgados en el presente documento, una disminución en la expansión, el enriquecimiento, la estimulación y/o la activación es una disminución estadísticamente significativa y/o al menos o al menos aproximadamente una disminución del 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o el 99,9 % de una medición asociada con la expansión, el enriquecimiento, la estimulación y/o la activación tomada de las células durante o después de la incubación con las partículas, por ejemplo, perlas.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la composición de entrada comprende células eucariotas, tal como células de mamífero. En determinados casos divulgados en el presente documento, la composición de entrada comprende células humanas. En algunos casos divulgados en el presente documento, la composición de entrada comprende células que proceden de la sangre, médula ósea, linfa u órganos linfoides. En casos particulares divulgados en el presente documento, la composición de entrada comprende células del sistema inmunitario, es decir, células de la inmunidad innata o adaptativa, por ejemplo, células mieloides o linfoides, incluyendo linfocitos, típicamente linfocitos T y/o linfocitos NK. En algunos casos divulgados en el presente documento, la composición de entrada comprende células madre, tales como las células madre multipotentes y pluripotentes, incluyendo células madre pluripotentes inducidas (iPSC). En casos particulares divulgados en el presente documento, la composición de entrada comprende células CD3⁺. En determinados casos divulgados en el presente documento, la composición de salida comprende células CD4⁺. En algunos casos divulgados en el presente documento, la composición de entrada comprende células CD8⁺. En algunos casos divulgados en el presente documento, la composición de entrada comprende células CD3⁺ que también expresan niveles bajos o nulos de CD28.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión estimula la activación y/o expansión de células que expresan niveles bajos de CD28 o células que son negativas para CD28. En determinados casos divulgados en el presente documento, las células no se ponen en contacto con reactivos conjugados con anti CD3/anti CD28 antes de poner en contacto las células con la molécula de unión.

En algunos casos divulgados en el presente documento, los métodos y partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden una molécula de unión (por ejemplo, reactivos conjugados con perlas como se divulga, tales como perlas conjugadas con anti ID o perlas conjugadas con BCMA) son capaces de estimular linfocitos T deficientes en o que han regulado negativamente una o más moléculas de señalización naturales tales como uno o más receptores coestimuladores o receptores de antígenos o receptores de citocinas pero que expresan el receptor quimérico, por ejemplo, el CAR, reconocido por la molécula de unión de los reactivos conjugados con perlas divulgados. En algunos casos divulgados en el presente documento, las células de la composición de entrada son bajas o negativas para la expresión superficial de CD28 u otra molécula coestimuladora u otra molécula de señalización. Por lo tanto, en algunos casos divulgados en el presente documento, los reactivos y métodos divulgados tienen ciertas ventajas en comparación con ciertos otros agentes o métodos de activación o estimulación que pueden requerir o depender de la expresión superficial de CD28 u otra molécula de señalización endógena, para proporcionar la señal deseada y/o la extensión completa de dicha señal, por ejemplo, para proporcionar una señal coestimuladora y/o para lograr una activación completa. En algunos casos divulgados en el presente documento, los agentes y métodos divulgados son ventajosos en tales aspectos en comparación con los reactivos anti CD3/anti CD28 (por ejemplo, perlas); en algunos casos divulgados en el presente documento, las partículas divulgadas, por ejemplo, perlas, que comprenden una molécula de unión (por ejemplo, reactivos conjugados con perlas como se divulga, tales como perlas conjugadas con anti ID o perlas conjugadas con BCMA) son ventajosas por ser capaces de estimular o lograr un efecto deseado tal como la activación o proliferación de células que son bajas o negativas para CD28 u otra molécula de señalización natural. En algunos casos divulgados en el presente documento, la señalización a través del CAR mediante la estimulación con un anticuerpo anti ID da como resultado tanto una señal primaria como secundaria (coestimuladora) a través del CAR usando solo el único reactivo. En algunos casos divulgados en el presente documento, la

composición de entrada comprende células CD3+ que expresan niveles bajos de CD28 u otra molécula de señalización endógena. En algunos casos divulgados en el presente documento, la composición de entrada comprende células CD3+ que son negativas para CD28 o son negativas para otras moléculas de señalización endógena. En algunos casos divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden una molécula de unión (por ejemplo, reactivos conjugados con perlas como se divulga, tales como perlas conjugadas con anti ID o perlas conjugadas con BCMA) estimulan la activación y/o expansión de células que expresan niveles bajos de CD28 o células que son negativas para CD28.

En casos particulares divulgados en el presente documento, la composición de entrada es o incluye linfocitos T humanos primarios. En algunos casos divulgados en el presente documento, la composición de entrada es o incluye linfocitos T CD4+ enriquecidos. En algunos casos divulgados en el presente documento, la composición de entrada es o incluye linfocitos T CD8+ enriquecidos. En determinados casos divulgados en el presente documento, la composición de entrada comprende células CD4+ y células CD8+. En casos particulares divulgados en el presente documento, la relación de las células CD4+ con respecto a las células CD8+ en la composición de entrada es superior a aproximadamente 50:1, o entre o entre aproximadamente 25:1 y 50:1, 10:1 y 25:1, 5:1 y 10:1, 3:1 y 5:1, 2:1 y 3:1, 1:1 y 2:1, 1:1 y 1:2, 2:1 y 1:2, 1:2 y 1:3, 1:3 y 1:5, 1:5 y 1:10, 1:10 y 1:25, o 1:25 y 1:50, cada uno inclusive.

En algunos casos divulgados en el presente documento, una composición de entrada comprende una población de células que han sido transducidas o transfectadas, o células que se obtienen de células que han sido transducidas o transfectadas, con uno o más ácidos nucleicos que codifican un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR, que está unido por o es reconocido por la molécula de unión de las partículas, por ejemplo, perlas. En algunos casos divulgados en el presente documento, la composición de entrada comprende una población de células que han sido transducidas o transfectadas, o células que se obtienen de células que han sido transducidas o transfectadas con uno o más ácidos nucleicos que codifican un receptor recombinante, que está unido por o es reconocido por la molécula de unión. En casos particulares divulgados en el presente documento, las células de la composición de entrada han sido transfectadas o transducidas por cualquier método como se describe en el presente documento, por ejemplo, en la Sección III. En determinados casos divulgados en el presente documento, el uno o más ácidos nucleicos han sido transfectados en la célula con un virus como se describe en el presente documento, por ejemplo, en la Sección III. En algunos casos divulgados en el presente documento, el uno o más ácidos nucleicos se han transfectado en la célula con un plásmido no vírico, por ejemplo, un episoma o un transposón, como se describe en el presente documento, por ejemplo, en la Sección III. En casos particulares divulgados en el presente documento, una composición de entrada comprende células que expresan un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR, en la superficie celular que está unido o es reconocido por la molécula de unión de las partículas, por ejemplo, perlas.

En casos particulares divulgados en el presente documento, la composición de entrada comprende una célula que expresa un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR, tal como uno que se obtiene de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, por ejemplo, en la Sección III.

En casos particulares divulgados en el presente documento, una composición de entrada no comprende inicialmente células que expresen un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR. En algunos casos divulgados en el presente documento, las células de una composición de entrada que no comprenden inicialmente células que expresan un receptor recombinante se ponen en contacto, se incuban o se tratan con partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden una molécula de unión al menos durante una porción de una transfección o transducción de las células con uno o más ácidos nucleicos que comprende un gen que expresa un receptor recombinante que está unido o es reconocido por la molécula de unión. En algunos casos divulgados en el presente documento, la transfección o transducción se realiza como se describe en el presente documento, por ejemplo, en la Sección III. En algunos casos divulgados en el presente documento, durante al menos una porción de la incubación con la molécula de unión, tras la introducción del ácido nucleico en las células, el receptor recombinante se expresa en la superficie de las células donde es capaz de interactuar con la molécula de unión. En casos particulares divulgados en el presente documento, la transfección o transducción se realiza sin ninguna etapa previa de expansión, activación y/o aislamiento. En determinados casos divulgados en el presente documento, las células no se incuban, ni se tratan ni se ponen en contacto con una o más moléculas estimuladoras policlonales capaces de activar uno o más dominios de señalización intracelular de uno o más componentes de un complejo TCR antes de la transfección o la transducción. En casos particulares divulgados en el presente documento, las células no se ponen en contacto con una o más moléculas estimuladoras policlonales que son anticuerpos anti CD3 y anti CD28 antes de la transducción o la transfección.

En determinados casos divulgados en el presente documento, la composición de entrada comprende células que expresan o no el receptor recombinante, por ejemplo, un CAR, que está unido por o es reconocido por la molécula de unión. En algunos casos divulgados en el presente documento, el tratamiento, la puesta en contacto o la incubación de las células de la composición de entrada con las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden la molécula de unión estimulará la activación y/o la expansión de las células que expresan el receptor recombinante, por ejemplo, un CAR, pero no estimulará la activación y/o la expansión de las células que no expresan el receptor recombinante. En determinados casos divulgados en el presente documento, el tratamiento, la puesta en contacto o la incubación de las células de la composición de entrada con las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden la molécula de unión que se une a o reconoce el receptor recombinante estimulará la activación y/o la expansión de las células que no expresan el receptor recombinante en un grado menor que las células que expresan el receptor recombinante.

En casos particulares divulgados en el presente documento, una porción de las células de la composición de entrada expresa o contiene ADN heterólogo que codifica un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR. En determinados casos divulgados en el presente documento, menos del 0,01 %, menos del 0,1 %, menos del 1 %, menos del 5 %, menos del 10 %, menos del 20 %, menos del 25 %, menos del 30 %, menos del 35 %, menos del 40 %, menos del 45 %, menos del 50 %, menos del 55 %, menos del 60 %, menos del 65 %, menos del 70 %, menos del 80 % o menos del 90 % de las células expresan o contienen uno o más ácidos nucleicos que contienen un gen que codifica un receptor recombinante. Las células que expresan el receptor recombinante o comprenden ADN heterólogo que codifica un receptor recombinante pueden identificarse por cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo, pero sin limitación, la detección de un ARNm que codifica el receptor recombinante en la célula, detectando directamente el receptor heterólogo, por ejemplo, mediante la detección de la unión de una sonda o anticuerpo marcado que se une al receptor recombinante, o mediante la detección de un marcador sustituto que está codificado por el ADN heterólogo. En algunos casos divulgados en el presente documento, las células que expresan el receptor recombinante se identifican mediante la detección de un marcador sustituto. En determinados casos divulgados en el presente documento, el marcador sustituto es un polipéptido EGFR truncado.

En casos particulares divulgados en el presente documento, las células de entrada son o incluyen células que fueron transfectadas y/o transducidas con una cantidad baja de partículas víricas, por ejemplo, perlas, una relación de copias de las partículas de vector vírico, por ejemplo, perlas, con respecto a células, y/o unidades infecciosas (UI), antes de la puesta en contacto con las partículas, por ejemplo, perlas. En casos particulares divulgados en el presente documento, las células de entrada, por ejemplo, células que se ponen en contacto, se incuban y/o se tratan con partículas, por ejemplo, perlas, que contienen una molécula de unión, son células que han sido transducidas con una cantidad menor de partículas víricas, una relación de copias de las partículas de vector vírico, por ejemplo, perlas, con respecto a las células, y/o UI, que las células de entrada que se expanden y/o se enriquecen mediante estimulación policlonal, por ejemplo, partículas recubiertas con anticuerpos anti CD3 y/o anti CD28. Por ejemplo, en algunos casos divulgados en el presente documento, la composición de entrada que se incubaba con las partículas, por ejemplo, perlas, que contienen moléculas de unión se genera a partir de células que fueron transducidas con o con al menos 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 o 60 UI menos por célula que una composición de entrada que se expande y/o se enriquece mediante estimulación policlonal. En algunos casos divulgados en el presente documento, la composición de entrada que se incubaba con las partículas, por ejemplo, perlas, que contienen una molécula de unión se genera a partir de células que se transdujeron con un valor de partículas de vector vírico, por ejemplo, perlas, con o con al menos 1×10^5 UI/ml, 5×10^5 UI/ml, 1×10^6 UI/ml, 5×10^6 UI/ml, 6×10^6 UI/ml, 7×10^6 UI/ml, 8×10^6 UI/ml, 9×10^6 UI/ml o 1×10^7 UI/ml menos que la composición de entrada que se expande y/o se enriquece mediante estimulación policlonal.

En casos particulares divulgados en el presente documento, la transducción de células con una alta UI/célula conducirá a una alta eficiencia de transducción pero, en algunos casos divulgados en el presente documento, también puede dar lugar a células transfectadas con un alto número de copias del vector (VCN), que pueden presentar riesgos de seguridad y no cumplir con las normas reguladoras. En casos particulares divulgados en el presente documento, reducir las UI/célula con las que se transducen las células reducirá la eficiencia de transducción, pero reducirá el VCN. En casos particulares divulgados en el presente documento, aumentar las UI/célula con las que se transducen las células aumentará la eficiencia de la transducción, pero también aumentará el VCN.

En casos particulares divulgados en el presente documento, la incubación, la puesta en contacto o el tratamiento de células de la composición de entrada con las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden una molécula de unión se realiza en condiciones para la estimulación, la expansión y/o la activación de células cuyas condiciones pueden incluir uno o más en particular de medios, temperatura, contenido de oxígeno, contenido de dióxido de carbono, tiempo, agentes, por ejemplo, nutrientes, aminoácidos, antibióticos, iones y/o factores estimuladores, tales como citocinas, quimiocinas, antígenos, compañeros de unión, proteínas de fusión, receptores solubles recombinantes y cualquier otro agente diseñado para activar las células.

En algunos casos divulgados en el presente documento, las células de la composición de entrada no expresan un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR, y se incuban, se ponen en contacto o se tratan con partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden una molécula de unión mientras están en contacto con uno o más ácidos nucleicos que comprenden un gen que codifica un receptor recombinante. En determinados casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión de las partículas, por ejemplo, perlas, se une a o reconoce el receptor recombinante que está codificado por el gen. En algunos casos divulgados en el presente documento, el uno o más ácidos nucleicos se suministran en una partícula de virus. En casos particulares divulgados en el presente documento, el uno o más ácidos nucleicos son un vector episomal. En algunos casos divulgados en el presente documento, el uno o más ácidos nucleicos son un transposón. En determinados casos divulgados en el presente documento, las células de la composición de entrada se tratan, se incuban o se ponen en contacto con las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden una molécula de unión al menos una porción del tiempo en que el uno o más ácidos nucleicos entran en contacto con las células de la composición de entrada. En casos particulares divulgados en el presente documento, las células se ponen en contacto con el uno o más ácidos nucleicos como se describe en el presente documento, por ejemplo, en la Sección III.

En algunos casos divulgados en el presente documento, las células de la composición de entrada han sido transfectadas o transducidas con un ácido nucleico que comprende un gen que codifica un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR; la composición de entrada comprende células que expresan un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR; y las células se ponen en contacto, se incuban o se tratan con partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden moléculas de unión que se unen a o reconocen el receptor recombinante. En algunos casos divulgados en el presente documento, las células de la composición de entrada se tratan, se incuban o se ponen en contacto con las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden una molécula de unión después de que las células se transducen o se transfectan. En algunos casos divulgados en el presente documento, las células de la composición de entrada se tratan, se incuban o se ponen en contacto con las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden una molécula de unión después de que las células se han transducido o transfectado con el uno o más ácidos nucleicos como se describe en el presente documento, por ejemplo, en la Sección III. En casos particulares divulgados en el presente documento, las células de la composición de entrada se tratan, se incuban o se ponen en contacto con las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden una molécula de unión inmediatamente, en el plazo de aproximadamente 1 minuto, en el plazo de aproximadamente 5 minutos, en el plazo de aproximadamente 30 minutos, en el plazo de aproximadamente 1 hora, en el plazo de aproximadamente 2 horas, en el plazo de aproximadamente 4 horas, en el plazo de aproximadamente 6 horas, en el plazo de aproximadamente 8 horas, en el plazo de aproximadamente 12 horas, en el plazo de aproximadamente 24 horas, en el plazo de aproximadamente 2 días, en el plazo de aproximadamente 3 días, en el plazo de aproximadamente 4 días, en el plazo de aproximadamente 5 días, en el plazo de aproximadamente 6 días, en el plazo de aproximadamente 1 semana, en el plazo de aproximadamente 2 semanas, en el plazo de aproximadamente 3 semanas, en el plazo de aproximadamente 4 semanas, en el plazo de aproximadamente 5 semanas, o en el plazo de aproximadamente 6 semanas tras el contacto de las células con el uno o más ácidos nucleicos.

En algunos casos divulgados en el presente documento, las células de la composición de entrada se transducen o se transfectan con el uno o más ácidos nucleicos que comprenden un gen que codifica un receptor recombinante, por ejemplo, como se describe en la Sección III, y las células se criocongelan posteriormente y se almacenan durante un tiempo antes de descongelarlas y expandirlas. En algunos casos divulgados en el presente documento, las células de la composición de entrada se han criocongelado y las células se ponen en contacto, se incuban o se tratan con las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden una molécula de unión en el plazo de o en el plazo de aproximadamente 1 minuto, 5 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas o 6 semanas después de que las células se descongelen.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la puesta en contacto, la incubación o el tratamiento de células de la composición de entrada con las partículas (por ejemplo, perlas) que comprenden una molécula de unión se realiza en un recipiente, por ejemplo, un plato de cultivo celular, un pocillo de cultivo celular o una bolsa.

En algunos casos divulgados en el presente documento, las células de la composición de entrada se ponen en contacto, se incuban o se tratan con las partículas, por ejemplo, perlas, en una relación de células totales de la composición de entrada con respecto a las partículas, por ejemplo, perlas, de entre o entre aproximadamente 100:1 a 1:100, 50:1 a 1:50, 25:1 a 1:25, 10:1 a 1:10, 5:1 a 1:5, 3:1 a 1:3, o 2:1 a 1:2. En casos particulares divulgados en el presente documento, la relación es de o de aproximadamente 1:0,1 a aproximadamente 1:5. En algunos casos divulgados en el presente documento, la relación de células totales de la composición de entrada con respecto a partículas, por ejemplo, perlas, es de aproximadamente 1:1.

En algunos casos divulgados en el presente documento, entre o entre aproximadamente 10^2 y 10^{12} , 10^3 y 10^{10} , 10^4 y 10^9 , 10^3 y 10^6 , 10^4 y 10^8 , 10^2 y 10^4 , 10^3 y 10^5 , 10^4 y 10^6 , 10^5 y 10^7 , o 10^6 y 10^8 células, cada uno inclusive, de la composición de entrada se ponen en contacto, se incuban o se tratan con las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden una molécula de unión. En determinados casos divulgados en el presente documento, menos de aproximadamente 10^2 , o entre o entre aproximadamente 10^2 y 10^3 , 10^3 y 10^4 , 10^4 y 10^5 , 10^5 y 10^6 , 10^6 y 10^7 , 10^7 y 10^8 , 10^8 y 10^9 , 10^9 y 10^{10} , 10^{10} y 10^{11} , o 10^{11} y 10^{12} células de la composición de entrada, cada uno inclusive, se ponen en contacto, se incuban o se tratan con las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden una molécula de unión.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la incubación o la puesta en contacto con células de una composición de entrada se realiza con una cantidad suficiente de partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden la molécula de unión para permitir la unión de la molécula de unión a una o más células en la composición de entrada y/o para inducir la estimulación, la activación y/o la proliferación de una o más células en la composición de entrada. El número o relación particular de partículas, por ejemplo, perlas, con respecto a las células de la composición de entrada se puede determinar empíricamente dependiendo de la cantidad particular de molécula de unión por perla, el antígeno particular, la fuente de células de la composición de entrada y otros factores dentro del nivel de un experto en la técnica.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la cantidad de partículas, por ejemplo, perlas, añadidas a las células de una composición de entrada es una cantidad para proporcionar entre o entre aproximadamente 1 molécula de unión y 10^{12} moléculas de unión por célula de la composición de entrada durante la incubación o la puesta en contacto, tal como entre o entre aproximadamente 10^2 moléculas de unión y 10^{10} moléculas de unión, 10^3 moléculas

de unión y 10^8 moléculas de unión, 10^4 moléculas de unión y 10^6 moléculas de unión, 1 molécula de unión y 10^2 moléculas de unión, 10^2 moléculas de unión y 10^3 moléculas de unión, 10^3 moléculas de unión y 10^4 moléculas de unión, 10^4 moléculas de unión y 10^5 moléculas de unión, 10^5 moléculas de unión y 10^6 moléculas de unión, 10^5 moléculas de unión y 10^6 moléculas de unión, 10^6 moléculas de unión y 10^7 moléculas de unión, 10^7 moléculas de unión y 10^8 moléculas de unión, 10^9 moléculas de unión y 10^{10} moléculas de unión, 10^{10} moléculas de unión y 10^{11} moléculas de unión, o 10^{11} moléculas de unión y 10^{12} moléculas de unión por célula, cada uno inclusive, en la composición de entrada durante la incubación o la puesta en contacto. En algunos casos divulgados en el presente documento, la cantidad de partículas, por ejemplo, perlas, añadidas a la composición de entrada es una cantidad para proporcionar entre aproximadamente 10^4 moléculas de unión y aproximadamente 10^6 moléculas de unión para cada célula en la composición de entrada durante la incubación o la puesta en contacto. En algunos casos divulgados en el presente documento, la cantidad de partículas, por ejemplo, perlas, contiene aproximadamente 10^5 moléculas de unión para cada célula en la composición de entrada durante la incubación o la puesta en contacto.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la cantidad de partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden la molécula de unión añadidas a la composición de entrada durante la incubación o la puesta en contacto es una cantidad de partículas, por ejemplo, perlas, que contiene entre o entre aproximadamente 0,0001 pg y aproximadamente 10 pg, 0,001 pg y 1 pg, 0,001 pg y 1 pg, 0,001 pg y 0,1 pg, 0,005 pg y 0,05 pg, 0,005 pg y 0,02 pg, o 0,01 pg y 0,05 pg de moléculas de unión, cada uno inclusive, para cada célula en la composición de entrada durante la incubación o la puesta en contacto. En algunos casos divulgados en el presente documento, la cantidad total de partículas, por ejemplo, perlas, añadidas a las células de la composición de entrada es una cantidad que proporciona entre o entre aproximadamente 0,0001 μg y 10 μg , 0,001 μg y 1 μg , 0,001 μg y 1 μg , 0,001 μg y 0,1 μg , 0,005 μg y 0,05 μg , 0,005 μg y 0,02 μg , o 0,01 μg y 0,05 μg de moléculas de unión, cada uno inclusive.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la cantidad de partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden la molécula de unión añadidas a la composición de entrada durante la incubación o la puesta en contacto es una cantidad de partículas, por ejemplo, perlas, que contiene al menos 10^{-20} mol, al menos 10^{-19} mol, al menos 10^{-18} mol, al menos 10^{-17} mol, al menos 10^{-16} mol, al menos 10^{-15} mol, al menos 10^{-14} mol, al menos 10^{-13} mol, al menos 10^{-12} mol, al menos 10^{-11} mol, o al menos 10^{-10} mol de moléculas de unión para cada célula en la composición de entrada durante la incubación o la puesta en contacto. En algunos casos divulgados en el presente documento, la cantidad contiene entre o entre aproximadamente 10^{-21} mol y 10^{-10} mol, 10^{-20} mol y 10^{-18} mol, 10^{-19} mol y 10^{-17} mol, o 10^{-21} mol y 10^{-19} mol de moléculas de unión, cada uno inclusive, para cada célula en la composición de entrada durante la incubación o la puesta en contacto. En algunos casos divulgados en el presente documento, la cantidad total de partículas, por ejemplo, perlas, añadidas a las células de la composición de entrada es una cantidad para proporcionar al menos 10^{-16} mol, al menos 10^{-15} mol, al menos 10^{-14} mol, al menos 10^{-13} mol, al menos 10^{-12} mol, al menos 10^{-11} mol, al menos 10^{-10} mol, al menos 10^{-9} mol, al menos 10^{-8} mol, al menos 10^{-7} mol, al menos 10^{-6} mol, al menos 10^{-5} mol, al menos 10^{-4} mol, al menos 10^{-3} mol, al menos 10^{-2} mol, al menos 10^{-1} mol, o al menos 1 mol de moléculas de unión.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la puesta en contacto o la incubación de las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden una molécula de unión con la composición de entrada se realiza en un volumen que está entre o entre aproximadamente 0,01 ml y 100 ml, tal como 0,01 ml y 50 ml, 0,01 ml y 25 ml, 0,01 ml y 10 ml, 0,01 ml y 5 ml, 0,01 ml y 1 ml, 0,01 ml y 0,5 ml, 0,01 ml y 0,1 ml, 0,01 ml y 0,05 ml, 0,05 ml y 100 ml, 0,05 ml y 50 ml, 0,05 ml y 25 ml, 0,05 ml y 10 ml, 0,05 ml y 5 ml, 0,05 ml y 1 ml, 0,05 ml y 0,5 ml, 0,05 ml y 0,1 ml, 0,1 ml y 100 ml, 0,1 ml y 50 ml, 0,1 ml y 25 ml, 0,1 ml y 10 ml, 0,1 ml y 5 ml, 0,1 ml y 1 ml, 0,1 ml y 0,5 ml, 0,5 ml y 100 ml, 0,5 ml y 50 ml, 0,5 ml y 25 ml, 0,5 ml y 10 ml, 0,5 ml y 5 ml, 0,5 ml y 1 ml, 1 ml y 100 ml, 1 ml y 50 ml, 1 ml y 25 ml, 1 ml y 10 ml, 1 ml y 5 ml, 5 ml y 100 ml, 5 ml y 50 ml, 5 ml y 25 ml, 5 ml y 10 ml, 10 ml y 100 ml, 10 ml y 50 ml, 10 ml y 25 ml, 25 ml y 100 ml, 25 ml y 50 ml o 50 ml y 100 ml, cada uno inclusive. En algunos casos divulgados en el presente documento, el volumen se proporciona por una solución, tal como un medio o un tampón farmacéuticamente aceptable.

En algunos casos divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden la molécula de unión son de una composición de partículas, por ejemplo, perlas, que tienen una concentración de moléculas de unión de al menos 0,001 $\mu\text{g/ml}$, al menos 0,01 $\mu\text{g/ml}$, al menos 0,1 $\mu\text{g/ml}$, al menos 0,5 $\mu\text{g/ml}$, al menos 1 $\mu\text{g/ml}$, al menos 1,5 $\mu\text{g/ml}$, al menos 2 $\mu\text{g/ml}$, al menos 3 $\mu\text{g/ml}$, al menos 4 $\mu\text{g/ml}$, al menos 5 $\mu\text{g/ml}$, al menos 6 $\mu\text{g/ml}$, al menos 7 $\mu\text{g/ml}$, al menos 8 $\mu\text{g/ml}$, al menos 9 $\mu\text{g/ml}$, al menos 10 $\mu\text{g/ml}$, al menos 50 $\mu\text{g/ml}$, al menos 100 $\mu\text{g/ml}$, al menos 500 $\mu\text{g/ml}$, al menos 1 mg/ml o al menos 10 mg/ml. En algunos casos divulgados en el presente documento, la composición de partículas contiene entre o entre aproximadamente 5×10^7 y 1×10^{10} partículas o perlas por ml, inclusive. En casos particulares divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden la molécula de unión son de una composición de partículas, por ejemplo, perlas, que tienen una concentración de moléculas de unión de entre o entre aproximadamente 0,001 $\mu\text{g/ml}$ a 10 mg/ml, 0,001 $\mu\text{g/ml}$ y 1 $\mu\text{g/ml}$, 0,001 $\mu\text{g/ml}$ y 1 $\mu\text{g/ml}$, 0,001 $\mu\text{g/ml}$ y 0,1 $\mu\text{g/ml}$, 0,01 $\mu\text{g/ml}$ y 1 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ y 10 $\mu\text{g/ml}$, 0,5 $\mu\text{g/ml}$ y 5 $\mu\text{g/ml}$, o 1 $\mu\text{g/ml}$ y 5 $\mu\text{g/ml}$. En algunos casos divulgados en el presente documento, la composición de partículas contiene entre o entre aproximadamente 5×10^7 y 1×10^{10} , 1×10^8 y 5×10^9 , o 4×10^8 y 4×10^9 partículas o perlas por ml, cada uno inclusive.

En determinados casos divulgados en el presente documento, la cantidad de partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden la molécula de unión añadidas a la composición de entrada durante la incubación o la puesta en contacto

es una cantidad de partículas, por ejemplo, perlas, que proporciona una concentración de 10^{-13} M, al menos 10^{-12} M, al menos 10^{-11} M, al menos 10^{-10} M, al menos 10^{-9} M, al menos 10^{-8} M, al menos 10^{-7} M, al menos 10^{-6} M, al menos 10^{-5} M, al menos 10^{-4} M, al menos 10^{-3} M, al menos 10^{-2} M, al menos 0,1 M, al menos 1 M o al menos 10 M de molécula de unión. En algunos casos divulgados en el presente documento, la cantidad de partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden la molécula de unión añadidas a la composición de entrada durante la incubación o la puesta en contacto es una cantidad de partículas, por ejemplo, perlas, que proporciona una concentración comprendida entre o entre aproximadamente 10^{-10} M y 10^{-3} M, 10^{-9} M y 10^{-6} M, 10^{-10} M y 10^{-7} M, o 10^{-9} M y aproximadamente 10^{-6} M, inclusive.

En casos particulares divulgados en el presente documento, las células de la composición de entrada se ponen en contacto, se incuban o se tratan con las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden la molécula de unión durante al menos o al menos aproximadamente 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 3 semanas o 4 semanas. En casos particulares divulgados en el presente documento, las células de la composición de entrada se ponen en contacto, se incuban o se tratan con las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden la molécula de unión durante menos de o menos de aproximadamente 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 6 horas, 12 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, o menos de o aproximadamente 12 días. En algunos casos divulgados en el presente documento, las células de la composición de entrada se ponen en contacto, se incuban o se tratan con las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden la molécula de unión durante un período de entre o entre aproximadamente 1 día y aproximadamente 14 días, 3 días y 7 días, o 4 días y 6 días, inclusive. En algunos casos divulgados en el presente documento, las células de la composición de entrada se ponen en contacto, se incuban o se tratan con las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden la molécula de unión durante aproximadamente 5 días. En determinados casos divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden una molécula de unión se ponen en contacto o se incuban con células de la composición de entrada, por ejemplo, que comprende células que expresan un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR, durante un período de tiempo determinado para expandir una o más células de la composición de entrada, tal como para expandir células de la composición de entrada que expresan el receptor recombinante. En casos particulares divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden una molécula de unión se ponen en contacto o se incuban con células de la composición de entrada, por ejemplo, que comprende células que expresan un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR, durante un período de tiempo para introducir de manera crónica la composición

En casos particulares divulgados en el presente documento, las células de una composición de entrada, por ejemplo, que comprende células que expresan un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR, se incuban, se ponen en contacto o se tratan con partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden una molécula de unión a temperaturas superiores a la temperatura ambiente para expandir las células de la composición de entrada que expresan el receptor recombinante. En algunos casos divulgados en el presente documento, el tratamiento, la incubación o la puesta en contacto se realiza a una temperatura superior a aproximadamente 25°C , tal como generalmente superior o superior a aproximadamente 32°C , 35°C o 37°C . En algunos casos divulgados en el presente documento, el tratamiento, la puesta en contacto o la incubación se realizan a una temperatura de o a aproximadamente $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, tal como a una temperatura de o a aproximadamente de 37°C .

En algunos casos divulgados en el presente documento, las células de la composición de entrada, por ejemplo, que comprende células que expresan un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR, se incuban, se tratan o se ponen en contacto con las partículas, por ejemplo, perlas, que contienen la molécula de unión y uno o más agentes adicionales (por ejemplo, agentes estimuladores y/o accesorios), por ejemplo, un ligando, que es capaz de activar un dominio de señalización intracelular de un complejo TCR.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el agente adicional está unido a la superficie de la partícula.

En determinados casos divulgados en el presente documento, el uno o más agentes adicionales están separados de las partículas, por ejemplo, perlas. En algunos casos divulgados en el presente documento, el uno o más agentes adicionales son una o más citocinas. En casos particulares divulgados en el presente documento, el uno o más agentes adicionales son o incluyen una o más citocinas recombinantes. En algunos casos divulgados en el presente documento, la una o más citocinas son citocinas recombinantes humanas. En determinados casos divulgados en el presente documento, la una o más citocinas se unen y/o son capaces de unirse a receptores que se expresan por y/o son endógenos de los linfocitos T. En casos particulares divulgados en el presente documento, la una o más citocinas son o incluyen uno o más miembros de la familia de citocinas del haz de 4 hélices alfa. En algunos casos divulgados en el presente documento, la una o más citocinas pueden incluir, pero sin limitación, interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-7 (IL-7), interleucina-9 (IL-9), interleucina-12 (IL-12), interleucina-15 (IL-15), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) y factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). En algunos casos divulgados en el presente documento, la una o más citocinas son o incluyen una o más de IL-2, IL-7 y IL-15.

En algunos casos divulgados en el presente documento, al menos una porción de las células de la composición de entrada expresan un CAR, y las células se incuban, se tratan o se ponen en contacto con partículas, por ejemplo, perlas, con moléculas de unión unidas, en donde las moléculas de unión son anticuerpos antiidiotipos, o fragmentos activos de los mismos, que se unen al dominio de unión a antígeno del CAR. En algunos casos divulgados en el presente documento, las células se incuban durante entre aproximadamente 3-7 días, inclusive. En casos particulares

divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, tienen un diámetro de aproximadamente 280 µm, las partículas, por ejemplo, perlas, comprenden aproximadamente 10^5 copias de las moléculas de unión, es decir, un anticuerpo anti CAR antiidiotipo, por partícula, y las células se incuban, se ponen en contacto y/o se tratan con las células en una relación de aproximadamente 1:1 partículas, por ejemplo, perlas, con respecto a las células.

En algunos casos divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, tienen un diámetro de aproximadamente 450 µm, las partículas, por ejemplo, perlas, comprenden aproximadamente entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 2×10^6 copias del anticuerpo anti CAR antiidiotipo, por partícula, y las células se incuban, se ponen en contacto y/o se tratan con las células en una relación de aproximadamente 1:1 partículas, por ejemplo, perlas, con respecto a las células.

Los casos particulares divulgados en el presente documento se refieren a un método para expandir células, que comprende incubar una composición de entrada que comprende células que expresan un CAR con un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a o reconoce BCMA con partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden una molécula de unión que se une a o reconoce el CAR. En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión es un polipéptido de fusión que comprende un dominio extracelular de BCMA humano y un dominio Fc en el extremo C. En algunos casos divulgados en el presente documento, las células se incuban durante entre aproximadamente 3-7 días. En casos particulares divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, tienen un diámetro de aproximadamente 280 µm, las partículas, por ejemplo, perlas, comprenden aproximadamente 10^5 copias de las moléculas de unión, es decir, polipéptidos de fusión BCMA, por partícula, y las células se incuban, se ponen en contacto y/o se tratan con las células en una relación de aproximadamente 1:1 partículas, por ejemplo, perlas, con respecto a las células. En algunos casos divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, tienen un diámetro de aproximadamente 450 µm, las partículas, por ejemplo, perlas, comprenden aproximadamente entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 2×10^6 copias de las moléculas de unión, es decir, polipéptidos de fusión BCMA, por partícula, y las células se incuban, se ponen en contacto y/o se tratan con las células en una relación de aproximadamente 1:1 partículas, por ejemplo, perlas, con respecto a las células.

En casos particulares divulgados en el presente documento, las células de la composición de entrada se ponen en contacto, se incuban o se tratan con las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden la molécula de unión durante un período de tiempo prolongado para realizar una estimulación a largo plazo, por ejemplo, más de 10 días. En algunos casos divulgados en el presente documento, las células que expresan un receptor recombinante se incuban, tal como, de forma continua o sin interrupción, con las partículas o perlas que contienen la molécula de unión durante al menos 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días o 16 días. En algunos casos divulgados en el presente documento, el período de tiempo elegido para la incubación es un tiempo en el que una o más funciones o actividades de las células de la composición exhiben características de células estimuladas de manera crónica o células que tienen una exposición prolongada al antígeno a la terminación al final de la incubación. En algunos casos divulgados en el presente documento, las células que expresan un receptor recombinante se incuban con las partículas o perlas para realizar un método de estimulación a largo plazo, tal como para modelar características de células estimuladas de manera crónica o células que tienen una exposición prolongada al antígeno.

Características de ejemplo de las composiciones de salida

En casos particulares divulgados en el presente documento, la puesta en contacto de células de la composición de entrada con partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden una molécula de unión (por ejemplo, reactivos conjugados con perlas como se divulga, tales como perlas conjugadas con anti ID o perlas conjugadas con BCMA) da como resultado una composición de salida que comprende al menos una propiedad, por ejemplo, número total de células, la porción o subconjunto de células que expresan un receptor recombinante, tasa de proliferación celular y/o expresión de un gen tal como un marcador de activación o marcador de agotamiento, que es diferente de una célula correspondiente de una composición de entrada. En algunos casos divulgados en el presente documento, los métodos dan lugar a proliferación, la activación, la estimulación, la liberación de citocinas u otro resultado funcional tal como regulación positiva de un marcador de activación o liberación o producción de citocinas, de células que expresan el receptor quimérico tal como el CAR reconocido por la molécula de unión. En algunos casos divulgados en el presente documento, dicha proliferación u otra respuesta o lectura funcional se induce en dichas células hasta un grado similar o mayor que el inducido por la incubación de las células con un agente y/o condiciones que estimulan la proliferación de linfocitos T, tal como perlas anti CD3/CD28 y/o anti CD3 reticulado.

En algunos casos divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden una molécula de unión se eliminan de la composición de salida. En algunos casos divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, son magnetizables o magnéticamente sensibles, por ejemplo, partículas paramagnéticas o superparamagnéticas, por ejemplo, perlas. En algunos casos divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, son oligómeros de estreptavidina. Se conocen métodos para eliminar partículas, por ejemplo, perlas, (por ejemplo, partículas de perlas, por ejemplo, perlas o partículas magnetizables) de las células. En algunos casos divulgados en el presente documento, se puede usar el uso de anticuerpos competidores no marcados, que, por ejemplo, se unen a la molécula de unión y alteran su afinidad por su receptor recombinante en la célula, permitiendo así un desprendimiento suave de la molécula de unión y, por lo tanto, la partícula. En algunos casos, después del desprendimiento, los anticuerpos competidores pueden permanecer asociados con la molécula de

unión de la partícula mientras que el anticuerpo no marcado sin reaccionar se elimina o puede eliminarse por lavado, y la célula queda libre de anticuerpo y de la molécula de unión. Un ejemplo de tal reactivo es DETACaBEAD (Friedl *et al.* 1995; Entschladen *et al.* 1997). En algunos casos divulgados en el presente documento, las partículas (por ejemplo, partículas de perlas) se pueden eliminar en presencia de un enlazador escindible (por ejemplo, enlazador de ADN), de modo que los anticuerpos unidos a partículas se conjugan con el enlazador (por ejemplo, CELlection, Dynal). En algunos casos, la región enlazadora proporciona un sitio escindible para eliminar las partículas (por ejemplo, partículas de perlas) de las células tras el aislamiento, por ejemplo, mediante la adición de DNasa u otro tampón de liberación. En algunos casos divulgados en el presente documento, también se pueden emplear otros métodos enzimáticos para la liberación de una partícula (por ejemplo, una partícula de perla) de las células. En algunos casos divulgados en el presente documento, las partículas (por ejemplo, partículas de perlas o partículas magnetizables) son biodegradables.

En algunos casos divulgados en el presente documento, las células de la composición de salida que se incubaron, se pusieron en contacto o se trataron con las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden la molécula de unión se comparan con una composición de salida que se obtuvo de una composición de entrada idéntica, es decir, una composición de entrada con la misma constitución celular, que se incubó, se trató o se puso en contacto con una o más moléculas estimuladoras policlonales capaces de activar uno o más dominios de señalización intracelular de uno o más componentes de un complejo TCR. En determinados casos divulgados en el presente documento, la composición de entrada idéntica no se trató con partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden moléculas de unión. En algunos casos divulgados en el presente documento, las células de la composición de entrada idéntica se pusieron en contacto, se incubaron o se trataron con la una o más moléculas estimuladoras policlonales en las mismas condiciones (por ejemplo, mismo medio, misma temperatura, misma duración y la misma cantidad y/o concentración de la una o más moléculas estimuladoras policlonales que la cantidad y/o concentración de las moléculas de unión) que las células de la composición de entrada que se trataron con las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden la molécula de unión. En algunos casos divulgados en el presente documento, las células de la composición de entrada idéntica se pusieron en contacto con una o más moléculas estimuladoras policlonales que están unidas a una superficie. En determinados casos divulgados en el presente documento, las células de la composición de entrada idéntica se pusieron en contacto con una o más moléculas estimuladoras policlonales que están unidas a una superficie de una partícula (por ejemplo, una partícula de perla). En casos particulares divulgados en el presente documento, las células de la composición de entrada idéntica se pusieron en contacto con una o más moléculas estimuladoras policlonales que son anticuerpos anti CD3 y anti CD28.

En casos particulares divulgados en el presente documento, el número de células en la composición de salida es al menos aproximadamente el 1 %, al menos aproximadamente el 5 %, al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 15 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 25 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 35 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 45 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 55 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 65 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 100 %, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 9 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 15 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 25 veces, al menos aproximadamente 50 veces o al menos aproximadamente 100 veces mayor que el número de células en la composición de entrada.

En determinados casos divulgados en el presente documento, la composición de salida comprende un mayor número de células después de la incubación, la puesta en contacto o el tratamiento con las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden la molécula de unión que una composición de salida que se obtuvo de una composición de entrada idéntica, es decir, una composición de entrada con la misma constitución celular, que se incubó, se trató o se puso en contacto con una o más moléculas estimuladoras policlonales capaces de activar uno o más dominios de señalización intracelular de uno o más componentes de un complejo TCR, por ejemplo, anticuerpos anti CD3 y anti CD28. En algunos casos divulgados en el presente documento, el número de células de la composición de salida que se trató con partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden la molécula de unión es al menos o al menos aproximadamente el 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 95 %, 100 %, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces o 100 veces mayor que el número de células de la composición de salida de la composición de entrada idéntica que se incubó, se trató o se puso en contacto con la una o más moléculas estimuladoras policlonales.

En casos particulares divulgados en el presente documento, las células de una composición de entrada se tratan, se ponen en contacto o se incuban con partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden una molécula de unión que se une a o es reconocida por el receptor recombinante expresado por un subconjunto de las células de una composición de entrada, dando como resultado así una composición de salida que comprende un subconjunto mayor de células que expresan el receptor recombinante que en la composición de entrada. En determinados casos divulgados en el presente documento, el subconjunto de células que expresan el receptor recombinante es al menos o al menos aproximadamente el 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 95 %, 100 %, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces,

20 veces, 50 veces o 100 veces mayor en la composición de salida que en la composición de entrada.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la composición de salida comprende un subconjunto más grande de células que expresan el receptor recombinante después de la incubación, la puesta en contacto o el tratamiento con las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden la molécula de unión que la composición de entrada antes de la incubación, la puesta en contacto o el tratamiento con las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden la molécula de unión. En algunos casos divulgados en el presente documento, al menos o al menos aproximadamente el 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 95 %, 98 %, 99 % o el 99,9 % de las células de la composición de salida expresan el receptor recombinante.

En determinados casos divulgados en el presente documento, la composición de salida comprende un subconjunto más grande de células que expresan el receptor recombinante que está unido o es reconocido por la molécula de unión, después de la incubación, la puesta en contacto o el tratamiento con las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden la molécula de unión que el subconjunto de células que expresan el receptor recombinante en una composición de salida que se obtuvo de una composición de entrada idéntica, que se incubó, se trató o se puso en contacto con una o más moléculas estimuladoras policlonales capaces de activar uno o más componentes de un complejo TCR, por ejemplo, anticuerpos anti CD3 y anti CD28. En algunos casos divulgados en el presente documento, el subconjunto de células que expresan el receptor recombinante en una composición de salida de células que se trataron con partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden la molécula de unión es al menos o al menos aproximadamente el 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 95 %, 100 %, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces o 100 veces mayor que el subconjunto de células que expresan el receptor recombinante de la composición de salida que se obtuvo de la composición de entrada idéntica que se incubó, se trató o se puso en contacto con una o más moléculas estimuladoras policlonales.

En algunos casos divulgados en el presente documento, las células que expresan el receptor recombinante, por ejemplo, el CAR, en la composición de salida que se incubó, se trató y/o se puso en contacto con las partículas, por ejemplo, perlas, que contienen una molécula de unión contienen al menos o al menos aproximadamente el 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 95 %, 98 %, 99 % o el 99,9 % menos de VCN que las células de una composición de salida que recibieron estimulación policlonal, por ejemplo, incubación con anticuerpos anti CD3 y/o anti CD28. En algunos casos divulgados en el presente documento, el VCN promedio de las células que expresan CAR de la salida no es más que aproximadamente 10, 5, 4, 2,5, 1,5 o 1.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la composición de salida comprende un subconjunto mayor de células activadas después de la incubación, la puesta en contacto o el tratamiento con las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden la molécula de unión que la composición de entrada antes de la incubación, la puesta en contacto o el tratamiento con las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden la molécula de unión. En algunos casos divulgados en el presente documento, las células activadas son células que expresan al menos un marcador de activación, es decir, un polinucleótido o un polipéptido asociado con la activación. En algunos casos divulgados en el presente documento, las células activadas expresan al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos diez o más de diez marcadores de activación diferentes. En algunos casos divulgados en el presente documento, el marcador de activación es el antígeno leucocitario humano relacionado con el antígeno D (HLA-DR), CD25, CD69, CD71, CD40L o 4-1BB (CD137). En casos particulares divulgados en el presente documento, el marcador de activación es IL-2, IFN gamma o TNF-alfa. En algunos casos divulgados en el presente documento, el marcador de activación es la expresión intracelular de IL-2, IFN gamma o TNF-alfa. En determinados casos divulgados en el presente documento, el marcador de activación es IL-2, IFN gamma o TNF-alfa secretados. En determinados casos divulgados en el presente documento, el subconjunto de células que expresan el marcador de activación es al menos o al menos aproximadamente 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 95 %, 100 %, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces o 100 veces mayor en la composición de salida que en la composición de entrada.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la composición de salida comprende una mayor cantidad de células activadas después de la incubación, la puesta en contacto o el tratamiento con las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden la molécula de unión que la composición de entrada antes de la incubación, la puesta en contacto o el tratamiento con las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden la molécula de unión. En algunos casos divulgados en el presente documento, al menos o al menos aproximadamente el 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 95 %, 98 %, 99 % o el 99,9 % de las células de la composición de salida están activadas. En algunos casos divulgados en el presente documento, menos de o menos de aproximadamente el 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 % o el 70 % de las células están activadas.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la composición de salida comprende un subconjunto más pequeño de células activadas después de la incubación, la puesta en contacto o el tratamiento con las partículas, por

ejemplo, perlas, que comprenden la molécula de unión que una composición de salida que se obtuvo de una composición de entrada idéntica, es decir, una composición de entrada con la misma constitución celular, que se incubó, se trató o se puso en contacto con una o más moléculas estimuladoras policlonales capaces de activar uno o más dominios de señalización intracelular de uno o más componentes de un complejo TCR. En algunos casos divulgados en el presente documento, el subconjunto de células activadas de la composición de salida que se trató con partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden la molécula de unión es menor o menor que aproximadamente el 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 95 %, 99 % o el 99,9 % del subconjunto de células activadas de la composición de salida procedente de la composición de entrada idéntica que se incubó, se trató o se puso en contacto con la una o más moléculas estimuladoras policlonales.

En casos particulares divulgados en el presente documento, las células de la composición de salida se activan más después de la incubación, la puesta en contacto o el tratamiento con las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden la molécula de unión que la composición de entrada antes de la incubación, la puesta en contacto o el tratamiento con las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden la molécula de unión. En algunos casos divulgados en el presente documento, las células se activan más cuando expresan un nivel mayor de al menos un marcador de activación que las células que están menos activadas o las células que no están activadas. En algunos casos divulgados en el presente documento, las células más activadas expresan al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos diez o más de diez marcadores de activación diferentes a niveles mayores que las células que están menos activadas o no activadas. En algunos casos divulgados en el presente documento, las células activadas expresan una mayor cantidad de al menos uno de antígeno leucocitario humano relacionado con el antígeno D (HLA-DR), CD25, CD69, CD71, CD40L o 4-1BB (CD137) que las células de la composición de entrada. En casos particulares divulgados en el presente documento, las células activadas expresan un mayor nivel de IL-2, IFN gamma o TNF-alfa, por ejemplo, ARNm o polipéptidos. En algunos casos divulgados en el presente documento, las células activadas expresan una mayor cantidad intracelular de IL-2, IFN gamma o TNF-alfa. En determinados casos divulgados en el presente documento, las células activadas secretan una mayor cantidad de IL-2, IFN gamma o TNF-alfa. En determinados casos divulgados en el presente documento, las células activadas expresan una cantidad de un marcador de activación que es al menos o al menos aproximadamente el 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 95 %, 100 %, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces o 100 veces mayor que la cantidad del marcador de activación expresado por las células de la composición de entrada.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la composición de salida comprende células que están menos activas después de la incubación, la puesta en contacto o el tratamiento con las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden la molécula de unión que una composición de salida que se obtuvo de una composición de entrada idéntica, es decir, una composición de entrada con la misma constitución celular, que se incubó, se trató o se puso en contacto con una o más moléculas estimuladoras policlonales capaces de activar uno o más dominios de señalización intracelular de uno o más componentes de un complejo TCR. En algunos casos divulgados en el presente documento, la expresión de al menos un marcador de activación en las células de la composición de salida que se trató con partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden la molécula de unión es menor o menor que aproximadamente el 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 95 %, 99 % o el 99,9 % de la expresión de al menos un marcador de activación en células de la composición de salida de la composición de entrada idéntica que se incubó, se trató o se puso en contacto con la una o más moléculas estimuladoras policlonales.

En algunos casos divulgados en el presente documento, un subconjunto mayor de células que expresan el receptor recombinante (que es reconocido por la molécula de unión) de la composición de salida se activan después de la incubación, la puesta en contacto o el tratamiento con las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden la molécula de unión que las células que expresan el receptor recombinante de la composición de entrada antes de la incubación, la puesta en contacto o el tratamiento con las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden la molécula de unión. En determinados casos divulgados en el presente documento, el subconjunto de células que expresan el receptor recombinante que se activan es al menos o al menos aproximadamente el 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 95 %, 100 %, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces o 100 veces mayor en la composición de salida que el subconjunto de células activadas que expresan el receptor recombinante de la composición de entrada.

En algunos casos divulgados en el presente documento, las células que expresan el receptor recombinante (al que se une o se reconoce por la molécula de unión) de la composición de salida comprenden un subconjunto mayor de células activadas después de la incubación, la puesta en contacto o el tratamiento con las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden la molécula de unión que la composición de entrada antes de la incubación, la puesta en contacto o el tratamiento con las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden la molécula de unión. En algunos casos divulgados en el presente documento, al menos o al menos aproximadamente el 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 95 %, 98 %, 99 % o el 99,9 % de las células que expresan el receptor recombinante de la composición de salida están activadas. En algunos casos divulgados en el presente documento, menos de o menos de aproximadamente el 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %,

30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 % de las células que expresan el receptor recombinante están activadas.

En algunos casos divulgados en el presente documento, un subconjunto más pequeño de las células que expresan el receptor recombinante (que se une a o es reconocido por la molécula de unión) de la composición de salida se activa después de la incubación, la puesta en contacto o el tratamiento con las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden la molécula de unión en comparación con las células que expresan el receptor recombinante de una composición de salida que se obtuvo de una composición de entrada idéntica, es decir, una composición de entrada con la misma constitución celular, que se incubó, se trató o se puso en contacto con una o más moléculas estimuladoras policlonales capaces de activar uno o más dominios de señalización intracelular de uno o más componentes de un complejo TCR. En algunos casos divulgados en el presente documento, el subconjunto de células que expresan el receptor recombinante de la composición de salida que se activan es menor que o menor que aproximadamente el 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 95 %, 99 % o el 99,9 % que el subconjunto de células que expresan el receptor recombinante de la composición de salida procedente de la composición de entrada idéntica que se incubó, se trató o se puso en contacto con la una o más moléculas estimuladoras policlonales.

En casos particulares divulgados en el presente documento, las células que expresan el receptor recombinante (que se une o es reconocido por la molécula de unión) de la composición de salida están más activas después de la incubación, la puesta en contacto o el tratamiento con las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden la molécula de unión que las células que expresan el receptor recombinante de la composición de entrada antes de la incubación, la puesta en contacto o el tratamiento con las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden la molécula de unión. En algunos casos divulgados en el presente documento, las células que expresan el receptor recombinante de la composición de salida expresan una mayor cantidad de al menos un marcador de activación en comparación con las células que expresan el receptor recombinante de la composición de entrada. En casos particulares divulgados en el presente documento, las células que expresan el receptor recombinante de la composición de salida expresan una mayor cantidad de al menos uno de antígeno leucocitario humano relacionado con el antígeno D (HLA-DR), CD25, CD69, CD71, CD40L o 4-1BB (CD137) que las células que expresan el receptor recombinante de la composición de entrada.

En casos particulares divulgados en el presente documento, las células que expresan el receptor recombinante expresan un mayor nivel de IL-2, IFN gamma o TNF-alfa. En algunos casos divulgados en el presente documento, las células que expresan el receptor recombinante expresan una mayor cantidad intracelular de IL-2, IFN gamma o TNF-alfa. En determinados casos divulgados en el presente documento, las células que expresan el receptor recombinante secretan una mayor cantidad de IL-2, IFN gamma o TNF-alfa. En determinados casos divulgados en el presente documento, las células que expresan el receptor recombinante de la composición de salida expresan una cantidad de un marcador de activación que es al menos o al menos aproximadamente el 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 95 %, 100 %, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces o 100 veces mayor que la cantidad del marcador de activación expresado por las células que expresan el receptor recombinante de la composición de entrada.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la composición de salida comprende células que expresan el receptor recombinante (que está unido o es reconocido por la molécula de unión) que están menos activos después de la incubación, la puesta en contacto o el tratamiento con las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden la molécula de unión que las células que expresan el receptor recombinante de una composición de salida que se obtuvo de una composición de entrada idéntica, es decir, una composición de entrada con la misma constitución celular, que se incubó, se trató o se puso en contacto con una o más moléculas estimuladoras policlonales capaces de activar uno o más dominios de señalización intracelular de uno o más componentes de un complejo TCR. En algunos casos divulgados en el presente documento, la expresión de al menos un marcador de activación en las células que expresan el receptor recombinante de la composición de salida que se trató con partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden la molécula de unión es menor o menor que aproximadamente el 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 95 %, 99 % o el 99,9 % de la expresión del al menos un marcador de activación en células que expresan el receptor recombinante de la composición de salida obtenida de la composición de entrada idéntica que se incubó, se trató o se puso en contacto con la una o más moléculas estimuladoras policlonales.

En algunos casos divulgados en el presente documento, las células de la composición de salida que se incubaron, se pusieron en contacto o se trataron con partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden una molécula de unión muestran un nivel de agotamiento reducido o inferior en comparación con las células que expresan el receptor recombinante de una composición de salida que se obtuvo de una composición de entrada idéntica, es decir, una composición de entrada con la misma constitución celular, que se incubó, se trató o se puso en contacto en las mismas condiciones, con una o más moléculas estimuladoras policlonales capaces de activar uno o más dominios de señalización intracelular de uno o más componentes de un complejo TCR. En casos particulares divulgados en el presente documento, las células de la composición de salida que se incubaron, se pusieron en contacto o se trataron con partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden una molécula de unión muestran una expresión reducida o inferior

de un marcador de agotamiento en comparación con las células de una composición de salida que se obtuvo de una composición de entrada idéntica que se incubó, se trató o se puso en contacto con una o más moléculas estimuladoras policlonales. En algunos casos divulgados en el presente documento, el marcador de agotamiento es un polipéptido que está asociado con el agotamiento, o es un polinucleótido que codifica un polipéptido que está asociado con el agotamiento. En algunos casos divulgados en el presente documento, la expresión de un marcador de agotamiento comprende la expresión superficial de un polipéptido marcador de agotamiento. En algunos casos divulgados en el presente documento, el marcador de agotamiento es un receptor inhibidor, es decir, un receptor que, cuando se une a su ligando correspondiente, reduce al menos una actividad inmunitaria o celular de la célula. En determinados casos divulgados en el presente documento, el marcador de agotamiento es PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, BTLA o TIGIT. En casos particulares divulgados en el presente documento, las células de la composición de salida que se pusieron en contacto, se trataron o se incubaron con las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden la molécula de unión tienen menos de o menos de aproximadamente el 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 95 %, 99 % o 99,9 % de la expresión de al menos un marcador de agotamiento que las células de una composición de salida que se puso en contacto, se trató o se incubó con una o más moléculas estimuladoras policlonales.

En casos particulares divulgados en el presente documento, las células que expresan el receptor recombinante de la composición de salida que se incubaron, se pusieron en contacto o se trataron con partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden una molécula de unión muestran un nivel de agotamiento reducido o menor en comparación con las células que expresan el receptor recombinante de una composición de salida que se obtuvo de una composición de entrada idéntica que se incubó, se trató o se puso en contacto con una o más moléculas estimuladoras policlonales capaces de activar uno o más dominios de señalización intracelular de uno o más componentes de un complejo TCR. En casos particulares divulgados en el presente documento, las células que expresan el receptor recombinante de la composición de salida que se incubaron, se pusieron en contacto o se trataron con partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden una molécula de unión muestran una expresión reducida o menor de un marcador de agotamiento en comparación con las células que expresan el receptor recombinante de una composición de salida que se obtuvo de una composición de entrada idéntica que se incubó, se trató o se puso en contacto, en las mismas condiciones, con una o más moléculas estimuladoras policlonales capaces de activar uno o más dominios de señalización intracelular de uno o más componentes de un complejo TCR. En casos particulares divulgados en el presente documento, las células que expresan un receptor recombinante de la composición de salida que se puso en contacto, se trató o se incubó con las partículas, por ejemplo, perlas, que comprenden la molécula de unión tienen menos de o menos de aproximadamente el 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 95 %, 99 % o el 99,9 % de la expresión del al menos un marcador de agotamiento que las células que expresan un receptor recombinante de una composición de salida que se puso en contacto, se trató o se incubó con una o más moléculas estimuladoras policlonales.

III. MÉTODOS PARA EVALUAR LA ESTIMULACIÓN A LARGO PLAZO

En el presente documento se divulga un método de estimulación a largo plazo (también denominado en el presente documento como un método para la estimulación a largo plazo) que es útil, entre otros, para evaluar fenotipos, características o actividades de una composición celular, por ejemplo, una composición celular. En algunos casos divulgados en el presente documento, el método de estimulación a largo plazo es o incluye la incubación de una composición celular, por ejemplo, una composición de entrada que contiene células que expresan un receptor recombinante tal como un CAR, en condiciones para estimular una actividad dependiente del receptor recombinante (por ejemplo, actividad dependiente de CAR) en las células. En algunos casos divulgados en el presente documento, la composición celular, por ejemplo, la composición de entrada, contiene linfocitos T que expresan un receptor recombinante (por ejemplo, un CAR) que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular que se une o reconoce específicamente un antígeno. En algunos casos divulgados en el presente documento, la incubación da como resultado una composición de linfocitos T, por ejemplo, una composición de salida, que contiene células que presentan características de células estimuladas de manera crónica o de células que han tenido una exposición prolongada al antígeno.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el método de estimulación a largo plazo es o incluye la incubación de una composición celular, por ejemplo, una composición de entrada que contiene células que expresan un receptor recombinante tal como un CAR, en condiciones para estimular una actividad dependiente del receptor recombinante (por ejemplo, actividad dependiente de CAR) en las células. En tales casos divulgados en el presente documento, una actividad dependiente del receptor recombinante es una actividad que es específica para la estimulación del receptor recombinante, por ejemplo, CAR, tal como a través de la presencia de un antígeno u otro agente reconocido por el dominio de unión a antígeno del receptor recombinante, por ejemplo, CAR, o que estimula específicamente el receptor recombinante. En algunos casos divulgados en el presente documento, la composición celular, por ejemplo, la composición de entrada, contiene linfocitos T que expresan un receptor recombinante (por ejemplo, un CAR) que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular que se une o reconoce específicamente un antígeno. En algunos casos divulgados en el presente documento, la incubación da como resultado una composición de linfocitos T, por ejemplo, una composición de salida, que contiene células que presentan características de células estimuladas de manera crónica o de células que han tenido una exposición prolongada al antígeno. En determinados casos divulgados en el presente documento, la incubación se realiza de forma continua

sin interrupción.

En determinados casos divulgados en el presente documento, los métodos para la estimulación a largo plazo divulgados en el presente documento son útiles, entre otros, para identificar composiciones celulares que puedan tener características deseables cuando se administran *in vivo*, tal como una persistencia, viabilidad o actividad mantenidas o prolongadas. En algunos casos divulgados en el presente documento, los métodos se realizan en dos o más composiciones celulares diferentes para identificar diferencias que puedan mejorar o prolongar la persistencia, la actividad o la viabilidad, o disminuir el agotamiento o la diferenciación, tal como cuando las células se administran *in vivo*. En algunos casos divulgados en el presente documento, dichas diferencias pueden incluir, pero sin limitación, aspectos del proceso de fabricación, tal como el tiempo, las condiciones o los reactivos usados en diferentes etapas del proceso de ingeniería, diferencias en el receptor recombinante (por ejemplo, diferencias en la secuencia de aminoácidos, diferencias en las construcciones o vectores usados para suministrar el receptor recombinante o diferentes métodos de suministro génico), diferencias en las células (por ejemplo, diferencias en el tipo o subtipo celular o en la fuente celular, tales como diferencias en las muestras o sujetos de los que se obtienen las células), diferentes condiciones de almacenamiento (por ejemplo, número de ciclos de congelación-descongelación anteriores, temperatura de almacenamiento, formulación del medio de almacenamiento, recipiente de almacenamiento, crioconservante o densidad celular) o condiciones de ensayo (tales como la presencia o ausencia de un compuesto de control o de prueba durante la incubación).

En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión es un antígeno (tal como un antígeno recombinante o un fragmento del mismo) que está unido o es reconocido por el receptor recombinante. En determinados casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión es un anti ID que se une a o reconoce el receptor recombinante. En algunos casos divulgados en el presente documento, dichas características pueden incluir evidencia de una disminución de la viabilidad, la actividad o la persistencia o un aumento del agotamiento o la diferenciación. En diversos casos divulgados en el presente documento, las células se incuban con las moléculas de unión en presencia de un medio sin agentes adicionales que promuevan la división, el crecimiento, la expansión o la activación celular. En algunos casos divulgados en el presente documento, las células se incuban con las partículas durante un período prolongado de tiempo, por ejemplo, 14 días, sin ninguna manipulación adicional, por ejemplo, cambios de medio, reemplazo de perlas o división o resiembra de las células.

Los casos particulares divulgados en el presente documento contemplan que los métodos de estimulación a largo plazo divulgados en el presente documento son útiles, entre otros, para modelar *ex vivo* las condiciones que experimentan las células de una terapia celular cuando se administran a un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano, *in vivo*. Por lo tanto, en algunos casos divulgados en el presente documento, el ensayo divulgado es útil para identificar composiciones celulares que puedan tener características deseables cuando se administran *in vivo*, tales como, pero sin limitación, una persistencia, viabilidad o actividad mantenidas o prolongadas.

En casos particulares divulgados en el presente documento, el método de estimulación a largo plazo se realiza en dos o más composiciones celulares, por ejemplo, composiciones de entrada, para identificar composiciones celulares que aumenten o mantengan la viabilidad, la actividad o la persistencia, o aumenten o mantengan la expresión de marcadores, por ejemplo, biomarcadores, indicativos de una mayor viabilidad, actividad o persistencia. En determinados casos divulgados en el presente documento, el método de estimulación a largo plazo se realiza en dos o más composiciones celulares para identificar diferencias en las composiciones celulares que disminuyen o previenen el agotamiento o la diferenciación (por ejemplo, tal como la diferenciación a un estado senescente), o disminuyen la expresión de marcadores indicativos de un mayor agotamiento o diferenciación. En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión está unida o conjugada a una superficie sólida, tal como una superficie de una placa o plato de cultivo celular. En casos particulares divulgados en el presente documento, las moléculas de unión están conjugadas o unidas a partículas, por ejemplo, perlas.

En determinados casos divulgados en el presente documento, los métodos incluyen etapas para incubar las células en presencia de partículas, por ejemplo, perlas, que contienen una molécula de unión, por ejemplo, una molécula de unión que se une a o reconoce el receptor recombinante. En algunos casos divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, que contienen la molécula de unión son o incluyen reactivos conjugados con perlas como se divulga, tales como perlas conjugadas con anti ID o perlas conjugadas con BCMA. En casos particulares divulgados en el presente documento, las células o composiciones de células se incuban con una partícula con una molécula de unión unida que se describe en el presente documento, por ejemplo, en la Sección I. En determinados casos divulgados en el presente documento, la partícula es una partícula descrita en el presente documento, por ejemplo, en la Sección I-A. En determinados casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión es una molécula de unión descrita en el presente documento, por ejemplo, en la Sección I-B. En casos particulares divulgados en el presente documento, la molécula de unión se une a o reconoce el receptor recombinante.

En casos particulares divulgados en el presente documento, la composición de entrada se incuba con la molécula de unión, tal como con partículas o perlas que contienen la molécula de unión, durante, durante aproximadamente, o durante al menos 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días, 16 días, 17 días, 18 días, 19 días, 20 días o 21 días. En diversos casos divulgados en el presente documento, la composición de entrada se incuba con la molécula de unión, por ejemplo, partículas o perlas que contienen la molécula de unión, durante entre o entre aproximadamente

- 10 días y 21 días, 12 días y 18 días, o 14 días y 16 días, inclusive. En determinados casos divulgados en el presente documento, las células se incuban con la molécula de unión, por ejemplo, partículas o perlas que contienen la molécula de unión, durante, durante aproximadamente, o durante al menos 14 días. En casos particulares divulgados en el presente documento, las células de la composición celular se incuban con la molécula de unión a temperaturas superiores a la temperatura ambiente. En algunos casos divulgados en el presente documento, la incubación se realiza a una temperatura superior a aproximadamente 25 °C, tal como generalmente superior o superior a aproximadamente 32 °C, 35 °C o 37 °C. En algunos casos divulgados en el presente documento, la incubación se realiza a una temperatura de o aproximadamente a 37 °C $\pm$ 2 °C, tal como a una temperatura de o a aproximadamente de 37 °C.
- En algunos casos divulgados en el presente documento, las células se incuban con las moléculas de unión, tales como con partículas o perlas que contienen moléculas de unión, en presencia de un medio sin agentes adicionales que promuevan la división, el crecimiento, la expansión o la activación celular, por ejemplo, de linfocitos T. En algunos casos divulgados en el presente documento, las células se incuban con las moléculas de unión en ausencia de cualquier citocina recombinante. En casos particulares divulgados en el presente documento, la incubación tiene lugar sin interrupción, por ejemplo, sin resiembra, reemplazo de medio o adición de moléculas de unión nuevas, etc. En determinados casos divulgados en el presente documento, la incubación tiene lugar en condiciones estáticas. En casos particulares divulgados en el presente documento, la incubación tiene lugar sin ninguna perfusión, mezcla, balanceo o agitación. En algunos casos divulgados en el presente documento, las partículas, por ejemplo, perlas, que contienen una molécula de unión están presentes durante toda la duración de la incubación. En determinados casos divulgados en el presente documento, las moléculas de unión no se cambian ni se reemplazan durante la incubación. Los casos particulares divulgados en el presente documento contemplan que, en algunos aspectos, el medio no contiene ninguna citocina recombinante, y las citocinas presentes en el medio durante la incubación habrían sido producidas por las células, por ejemplo, en respuesta a una interacción entre el receptor recombinante de la célula y la molécula de unión de la partícula.
- En algunos casos divulgados en el presente documento, los métodos divulgados para la estimulación a largo plazo pueden usarse para comparar diferentes células o composiciones celulares. Por ejemplo, en algunos casos divulgados en el presente documento, dos o más composiciones celulares que contienen cada una células que expresan el mismo receptor recombinante, por ejemplo, un mismo CAR, pueden compararse incubando las células con la misma molécula de unión, por ejemplo, partículas o perlas que contienen la misma molécula de unión, que se une a o reconoce el receptor recombinante. En determinados casos divulgados en el presente documento, las dos o más composiciones celulares se generan mediante diferentes procesos de ingeniería, tales como procesos que implican diferentes condiciones, diferentes tiempos y duraciones, o diferentes equipos o reactivos. En casos particulares divulgados en el presente documento, las composiciones celulares se incuban con partículas, por ejemplo, perlas, que contienen una molécula de unión en presencia de uno o más agentes o compuestos de prueba, tales como agentes sospechosos de reducir el agotamiento o promover la persistencia. En casos particulares divulgados en el presente documento, las composiciones celulares pueden compararse con una composición celular de control o de referencia. En algunos casos divulgados en el presente documento, las composiciones celulares de control o de referencia pueden incluir, pero sin limitación, composiciones celulares que no se someten a ninguna incubación, composiciones de células que no se incuban en presencia de partículas, por ejemplo, perlas, que contienen una molécula de unión, composiciones celulares que no contienen células que expresen el receptor recombinante, composiciones celulares que se generan a partir de un proceso de ingeniería diferente y/o composiciones celulares que se incuban en presencia de un vehículo o compuesto de control.
- En algunos casos divulgados en el presente documento, el método de estimulación a largo plazo se realiza en presencia de uno o más agentes o compuestos de prueba. En casos particulares divulgados en el presente documento, el agente o compuesto de prueba es un agente sospechoso de o candidato para cambiar o influir en una o más características, fenotipos o actividades de células de la composición celular, por ejemplo, células que expresan el receptor recombinante durante o después de la incubación. En algunos casos divulgados en el presente documento, el agente o compuesto de prueba aumenta o disminuye, o se sospecha que aumenta o disminuye, uno o más fenotipos, características o actividades de linfocitos T, tales como el crecimiento, la división, la expansión, la división, la persistencia, la diferenciación, la activación o el agotamiento, o actividades, tales como actividades estimuladas por antígenos incluyendo, pero sin limitación, actividad citolítica o producción de citocinas. En determinados casos divulgados en el presente documento, un agente o compuesto de prueba es un polipéptido natural o modificado químicamente, un anticuerpo, un oligopéptido pequeño natural o modificado químicamente, un aminoácido natural, no natural o modificado químicamente, un polinucleótido, un oligonucleótido natural o modificado químicamente, ARNi, ARNh_c, ARNi_p, un nucleótido pequeño, un mononucleótido natural o modificado químicamente, un lipopéptido, un antimicrobiano, una molécula pequeña o una molécula farmacéutica.
- En casos particulares divulgados en el presente documento, dos o más composiciones celulares que contienen cada una células que expresan los diferentes receptores recombinantes, por ejemplo, diferentes CAR, pueden compararse incubando las células con moléculas de unión, tales como con partículas o perlas que contienen diferentes moléculas de unión que se unen a o reconocen los diferentes receptores recombinantes.
- En algunos casos divulgados en el presente documento, la composición de salida está compuesta por células que se han sometido a todo o una porción de un método de estimulación a largo plazo, por ejemplo, un método de estimulación

a largo plazo descrito en el presente documento. En determinados casos divulgados en el presente documento, las células que se someten al método de estimulación a largo plazo se evalúan en diferentes puntos temporales durante la incubación. Por ejemplo, en algunos casos divulgados en el presente documento, un fenotipo, característica o actividad de células de una o más composiciones celulares se evalúan en un punto temporal intermedio, tal como un punto temporal que tiene lugar en, en aproximadamente o al menos el 5 %, 10 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 90 %, de finalización de la incubación. En determinados casos divulgados en el presente documento, las células se evalúan una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, seis veces, siete veces, ocho veces, nueve veces, diez veces o más de diez veces durante la incubación. En determinados casos divulgados en el presente documento, las células se evalúan siguiendo diferentes intervalos durante la incubación, tal como un intervalo de, de aproximadamente, o de al menos 6 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días u 8 días. En algunos casos divulgados en el presente documento, las células se evalúan todos los días. En algunos casos divulgados en el presente documento, las células se evalúan cada tres días. En determinados casos divulgados en el presente documento, las células se evalúan cada 7 días.

En determinados casos divulgados en el presente documento, las células de la composición de salida, por ejemplo, células que se han sometido al método de estimulación a largo plazo, se evalúan para determinar una actividad, por ejemplo, una actividad simulada de antígeno, un fenotipo o una característica. En algunos casos divulgados en el presente documento, se evalúa la actividad estimulada por antígenos en células durante o después de que se complete el método, por ejemplo, durante o después de la incubación con las moléculas de unión. En casos particulares divulgados en el presente documento, los resultados de la evaluación se comparan con una evaluación de la misma actividad o una actividad similar medida en células de una composición celular diferente, por ejemplo, una composición celular de control o de referencia.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la actividad es una actividad estimulada por antígenos. Los casos particulares divulgados en el presente documento contemplan que la actividad estimulada por antígenos de las células, tales como linfocitos T que expresan un receptor recombinante, se puede evaluar mediante cualquiera de varias técnicas adecuadas conocidas. En algunos casos divulgados en el presente documento, la producción de una o más citocinas se mide, se detecta y/o se cuantifica mediante tinción intracelular de citocinas. En algunos casos divulgados en el presente documento, la tinción intracelular de citocinas (ICS) mediante citometría de flujo es una técnica muy adecuada para estudiar la producción de citocinas a nivel de células individuales. En determinados casos divulgados en el presente documento, la ICS es útil para detectar la producción y acumulación de citocinas dentro del retículo endoplasmático después de la estimulación celular, tal como con una célula que expresa el antígeno o una partícula, por ejemplo, una partícula de perla, con un antígeno conjugado, lo que permite la identificación de poblaciones celulares que son positivas o negativas para la producción de una citocina particular o para la separación de células de alta producción y de baja producción en función de un umbral. La ICS también se puede usar junto con otros protocolos de citometría de flujo para inmunofenotipado usando marcadores de superficie celular, por ejemplo, CD4 o CD8, para acceder a la producción de citocinas en un subgrupo particular de células. Otras técnicas de células individuales para medir o detectar la producción de citocinas incluyen, pero sin limitación, ELISPOT, dilución limitante y clonación de linfocitos T.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la actividad estimulada por antígenos es la producción de una o más citocinas. Las citocinas que pueden producirse en respuesta a la estimulación antigénica pueden incluir, pero sin limitación, IL-1, IL-1 β , IL-2, sIL-2Ra, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-21, IL-23, IL-25, IL-27, IL-33, IL-35, TNF, TNF alfa, CXCL2, CCL2, CCL3, CCL5, CCL17, CCL24, PGD2, LTB4, interferón gamma (IFN- γ), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-1a, MIP-1b, Flt-3L, fractalkina y/o IL-5. En algunos casos divulgados en el presente documento, la una o más citocinas son o incluyen una o más de IL-2, IFN-gamma o TNF-alfa. En algunos casos divulgados en el presente documento, la secreción de citocinas se evalúa midiendo, detectando o cuantificando la cantidad o concentración de citocinas extracelulares después de un cocultivo con células que expresan antígeno o después de una incubación de partículas, por ejemplo, perlas, que contienen antígeno o fragmentos de antígeno unidos.

En casos particulares divulgados en el presente documento, la actividad estimulada por antígenos es actividad citolítica (citotóxica). En algunos casos divulgados en el presente documento, la actividad citolítica se evalúa exponiendo, incubando y/o poniendo en contacto las células de la composición, por ejemplo, células que expresan el receptor recombinante, con una célula diana que expresa el antígeno o un epítipo que es reconocido por el receptor recombinante. La actividad citolítica se puede medir midiendo directa o indirectamente el número de células diana en el tiempo. Por ejemplo, las células diana pueden incubarse con un marcador detectable antes de incubarlas con células que expresan receptores recombinantes, tal como un marcador que sea detectable cuando la célula diana se lisa, o un marcador detectable que sólo sea detectable en células diana viables. Estas lecturas proporcionan información directa o indirecta sobre el número de células diana y/o la muerte de células diana, y se pueden medir en diferentes puntos temporales durante el ensayo. Una reducción del número de células diana y/o un aumento de la muerte de células diana indican la actividad citolítica de las células. En la técnica se conocen métodos adecuados para realizar ensayos citolíticos, e incluyen, pero sin limitación, ensayos de liberación de cromo-51, ensayos de cromo no radiactivo, ensayos de citometría de flujo que usan colorantes fluorescentes tales como succinimidil éster de carboxifluoresceína (CFSE), PKH-2 y PKH-26.

En determinados casos divulgados en el presente documento, las células, por ejemplo, células que expresan el receptor recombinante, de la composición se evalúan para determinar una o más características o fenotipos durante o después del ensayo, por ejemplo, durante o después de una incubación con partículas, por ejemplo, perlas, que contienen un receptor de unión. En algunos casos divulgados en el presente documento, la una o más características o fenotipos son o se relacionan con uno o más de la activación, el agotamiento o la diferenciación. En determinados casos divulgados en el presente documento, el uno o más fenotipos o características se evalúan midiendo, detectando o cuantificando la presencia, la ausencia, la cantidad o el nivel de uno o más marcadores.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la expresión de un marcador, por ejemplo, un biomarcador, que está asociada positiva o negativamente con la activación, el agotamiento o la diferenciación, es o incluye evaluar, medir, determinar y/o cuantificar un nivel, cantidad o concentración de un marcador en la muestra. En determinados casos divulgados en el presente documento, el marcador es un producto génico, por ejemplo, cualquier biomolécula que es ensamblada, generada y/o sintetizada con información codificada por un gen, y puede incluir polinucleótidos y/o polipéptidos. En determinados casos divulgados en el presente documento, el nivel, la cantidad o la concentración del marcador puede transformarse (por ejemplo, normalizarse) o analizarse directamente (por ejemplo, en bruto). En algunos casos divulgados en el presente documento, el marcador es una proteína. En determinados casos divulgados en el presente documento, el marcador es un polinucleótido, por ejemplo, un ARNm o una proteína, que se codifica por el gen.

En casos particulares divulgados en el presente documento, la cantidad o el nivel de un marcador que es un polinucleótido puede evaluarse, medirse, determinarse y/o cuantificarse por cualquier medio conocido adecuado. Por ejemplo, en algunos casos divulgados en el presente documento, la cantidad o el nivel de un marcador de polinucleótido se puede evaluar, medir, determinar y/o cuantificar por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), incluyendo PCR con transcriptasa inversa (rt), PCR digital en gotas, métodos de PCR en tiempo real y cuantitativa (incluyendo, por ejemplo, TAQMAN®, baliza molecular, LIGHTUP™, SCORPION™, SIMPLEPROBES®, véanse, por ejemplo, las Pat. de EE. UU. N.º 5.538.848; 5.925.517; 6.174.670; 6.329.144; 6.326.145 y 6.635.427); transferencia de Northern; transferencia de Southern, por ejemplo, de productos de transcripción inversa y derivados; métodos basados en matrices, incluyendo matrices transferidas, micromatrices matrices sintetizadas *in situ*; y secuenciación, por ejemplo, secuenciación por síntesis, pirosecuenciación, dideoxi secuenciación o secuenciación por ligadura, o cualquier otro método conocido en la técnica, tal como se analiza en Shendure *et al.*, Nat. Rev. Genet. 5:335-44 (2004) o Nowrousian, Euk. Cell 9(9): 1300-1310 (2010), incluyendo plataformas específicas tales como secuenciación HELICOS®, ROCHE® 454, ILLUMINA®/SOLEXA®, ABI SOLiD® y POLONATOR®. En casos particulares divulgados en el presente documento, los niveles de productos génicos de ácidos nucleicos se miden por qRT-PCR. En algunos casos divulgados en el presente documento, la qRT-PCR usa tres conjuntos de ácidos nucleicos para cada gen, donde los tres ácidos nucleicos comprenden un par de cebadores junto con una sonda que se une entre las regiones de un ácido nucleico diana donde se unen los cebadores, conocido comercialmente como ensayo TAQMAN®.

En casos particulares divulgados en el presente documento, la expresión de dos o más marcadores de polinucleótidos se mide o evalúa simultáneamente. En determinados casos divulgados en el presente documento, una PCR multiplex, por ejemplo, una rt-PCR multiplex que evalúa, mide, determina y/o cuantifica el nivel, la cantidad o la concentración de dos o más productos génicos. En algunos casos divulgados en el presente documento, se usan micromatrices (por ejemplo, matrices de tipo AFFYMETRIX®, AGILENT® e ILLUMINA®) para evaluar, medir, determinar y/o cuantificar el nivel, la cantidad o la concentración de dos o más productos génicos. En algunos casos divulgados en el presente documento, las micromatrices se usan para evaluar, medir, determinar y/o cuantificar el nivel, la cantidad o la concentración de un polinucleótido de ADNc que se obtiene de un producto génico de ARN.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la expresión de uno o más marcadores de polinucleótidos se determina mediante la secuenciación de un ARNm marcador o un polinucleótido de ADNc que se obtiene del ARNm marcador. En algunos casos divulgados en el presente documento, la secuenciación se realiza mediante un método de secuenciación no Sanger y/o una técnica de secuenciación de última generación (NGS). Los ejemplos de técnicas de secuenciación de última generación incluyen, pero sin limitación, secuenciación masiva en paralelo de distintivos (MPSS), secuenciación con polonio, pirosecuenciación, secuenciación de terminador con colorante reversible, secuenciación SOLiD, secuenciación de semiconductores iónicos, secuenciación de nanoesferas de ADN, secuenciación de molécula única Helioscope, secuenciación en tiempo real de molécula única (SMRT), secuenciación en tiempo real de molécula única (RNAP) y secuenciación de ADN Nanopore.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la técnica de NGS es la secuenciación de ARN (RNA-Seq). En casos particulares divulgados en el presente documento, la expresión del uno o más productos génicos polinucleotídicos se mide, se determina y/o se cuantifica mediante RNA-Seq. La RNA-Seq, también llamada secuenciación en perdigonada del transcriptoma completo, determina la presencia y cantidad de ARN en una muestra. Los métodos de secuenciación de ARN se han adaptado a las plataformas de secuenciación de ADN más habituales [sistemas HiSeq (Illumina), sistema 454 Genome Sequencer FLX (Roche), Applied Biosystems SOLiD (Life Technologies), IonTorrent (Life Technologies)]. Estas plataformas requieren la transcripción inversa inicial del ARN en ADNc. Por el contrario, el secuenciador de molécula única HeliScope (Helicos BioSciences) es capaz de usar ARN como molde para la secuenciación. También se ha demostrado una prueba de principio para la secuenciación directa de ARN en la plataforma PacBio RS (Pacific Bioscience). En algunos casos divulgados en el presente documento, el

uno o más productos génicos de ARN se evalúan, se miden, se determinan y/o se cuantifican mediante RNA-Seq. En algunos casos divulgados en el presente documento, la RNA-seq es una secuencia de ARN basada en etiquetas o una secuencia de ARN en pedigonada.

- 5 En casos particulares divulgados en el presente documento, el marcador es una proteína o un fragmento de la misma. En determinados casos divulgados en el presente documento, uno o más marcadores de proteínas se miden mediante cualquier medio adecuado conocido en la técnica. Los métodos adecuados para evaluar, medir, determinar y/o cuantificar el nivel, la cantidad o la concentración de más o más marcadores de proteínas incluyen, pero sin limitación, la detección con inmunoensayos, técnicas de aptámeros a base de ácidos nucleicos o proteínas, HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento), secuenciación de péptidos (tal como la secuenciación por degradación de Edman o la espectrometría de masas (tal como MS/MS), opcionalmente acoplada a HPLC) y adaptaciones de micromatrices de cualquiera de los anteriores (incluyendo las matrices de ácidos nucleicos, anticuerpos o proteína-proteína (es decir, diferentes de anticuerpos)). En algunos casos divulgados en el presente documento, el inmunoensayo es o incluye métodos o ensayos que detectan proteínas basándose en una reacción inmunitaria, por ejemplo, detectando la unión de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígeno a un producto génico. Los inmunoensayos incluyen, pero sin limitación, inmunocitoquímica cuantitativa o inmunohistoquímica, ELISA (incluyendo ELISA directo, indirecto, sándwich, competitivo, múltiple y portátil (véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. N.º 7.510.687), transferencia de Western (incluyendo la transferencia de una, dos o más dimensiones u otros medios cromatográficos, incluyendo opcionalmente secuenciación peptídica), inmunoensayo enzimático (EIA), RIA (radioinmunoanálisis) y SPR (resonancia de plasmón superficial).

- En algunos casos divulgados en el presente documento, el marcador de proteínas se mide, se detecta o se cuantifica mediante citometría de flujo. En algunos casos divulgados en el presente documento, la citometría de flujo es una tecnología biofísica basada en láser o impedancia empleada en la detección de marcadores suspendiendo células en una corriente de fluido y pasándolas a través de un aparato de detección electrónica. Los marcadores presentes en las células pueden marcarse, tal como con un anticuerpo marcado con fluorescencia para su detección mediante citometría de flujo. En algunos casos divulgados en el presente documento, se emplea la citometría de flujo para medir, detectar o cuantificar la presencia, ausencia, cantidad o nivel de un marcador presente en una población de células. En algunos casos divulgados en el presente documento, la población de células puede ser la totalidad o la totalidad de células viables de la composición celular o de un subconjunto de células de la composición celular, por ejemplo, células positivas para el receptor recombinante, linfocitos T CD4+ o linfocitos T CD8+.

- En casos particulares divulgados en el presente documento, el marcador está asociado o correlacionado positivamente con la activación o un estado similar a la activación. En algunos casos divulgados en el presente documento, el marcador es o incluye CD25, CD26, CD27, CD28, CD30, CD71, CD154, CD40L, CD127, LAG3 o Ki67. En algunos casos divulgados en el presente documento, el marcador está asociado o correlacionado positivamente con el agotamiento o una condición relacionada con el agotamiento. En casos particulares divulgados en el presente documento, el marcador es o incluye uno o más de CTLA-4, FOXP3, PD-1, TIGIT, LAB-3, 2B4, BTLA, TIM3, VISTA o CD96. En algunos casos divulgados en el presente documento, el marcador está asociado con la diferenciación de un linfocito T. En casos particulares divulgados en el presente documento, el marcador es o incluye uno o más de CD25, CD45RO, CD56, KLRG1, CD95 y/o uno o más de CD45RA, CD27, CD28, CD62L y CCR7. En algunos casos divulgados en el presente documento, las células, por ejemplo, las células de la composición de salida, se evalúan para determinar células que son positivas en la superficie para un marcador de activación de linfocitos T seleccionado del grupo que consiste en CD45RA, CD27, CD28, CD62L y CCR7; y/o que son negativas en la superficie para un marcador seleccionado del grupo que consiste en CD25, CD45RO, CD56, KLRG1; y/o tienen baja expresión de CD95; y/o son negativas para la expresión intracelular de una citocina seleccionada del grupo que consiste en IL-2, IFN-γ, IL-4, IL-10. En algunos casos, la composición de salida se evalúa para determinar las células que son CD45RA+, CD27+, CCR7+ y/o CD45RO-.

- En algunos casos divulgados en el presente documento, las células de una composición celular, por ejemplo, la composición celular de salida, muestran características de células que han experimentado una estimulación prolongada o crónica después del método de estimulación a largo plazo, por ejemplo, después de una incubación con las partículas, por ejemplo, perlas, que contienen una molécula de unión. En algunos casos divulgados en el presente documento, las células que expresan el receptor recombinante de una composición celular, por ejemplo, una composición celular de referencia o de control, muestran características de células que han experimentado una estimulación prolongada o crónica después del ensayo, por ejemplo, después de una incubación con las partículas, por ejemplo, perlas, que contienen una molécula de unión.

- En algunos casos divulgados en el presente documento, las células de composiciones de salida que han experimentado el método de estimulación a largo plazo, por ejemplo, una incubación con las partículas, por ejemplo, perlas, que contienen una molécula de unión, muestran una actividad estimulada por antígenos reducida en comparación con las células de la composición que no se sometieron al método de estimulación a largo plazo. En determinados casos divulgados en el presente documento, la actividad estimulada por antígenos se reduce en, en aproximadamente, o en al menos un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 %, 99,9 % o en o en aproximadamente un 100 % en comparación con las células de la composición que no se sometieron al método de estimulación a largo plazo. En determinados casos divulgados en el presente

documento, la actividad estimulada por antígenos se reduce en una cantidad detectable y estadísticamente significativa en comparación con las células de la composición que no se sometieron al método de estimulación a largo plazo. En algunos casos divulgados en el presente documento, la producción de citocinas estimulada por antígenos se reduce en comparación con las células de la composición que no se sometieron al método de estimulación a largo plazo. En casos particulares divulgados en el presente documento, la secreción de citocinas estimulada por antígenos se reduce en comparación con las células de la composición que no se sometieron al método de estimulación a largo plazo. En casos particulares divulgados en el presente documento, la actividad citolítica estimulada por antígenos se reduce en comparación con las células de la composición que no se sometieron al método de estimulación a largo plazo.

En casos particulares divulgados en el presente documento, las células de composiciones de salida, tales como células de composiciones de control o de referencia, muestran un nivel, expresión o cantidad reducida de células positivas para un marcador asociado con linfocitos T de tipo indiferenciado, en comparación con las células de la composición que no se sometieron al método de estimulación a largo plazo. En determinados casos divulgados en el presente documento, la cantidad de células positivas para el marcador, tal como un marcador, por ejemplo, que tiene una cantidad detectable del marcador o una cantidad o expresión por encima de un nivel umbral o cantidad de tinción, se reduce en, en aproximadamente, o en al menos un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 %, 99,9 % o en o en aproximadamente un 100 % en comparación con las células de la composición que no se sometieron al método de estimulación a largo plazo. En determinados casos divulgados en el presente documento, la cantidad de células positivas para el marcador se reduce en una cantidad detectable, estadísticamente significativa en comparación con las células de la composición que no se sometieron al método de estimulación a largo plazo.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la expresión, cantidad o nivel promedio, medio o en la mediana de un marcador, tal como un marcador asociado con la activación o un marcador asociado positivamente con un estado de tipo indiferenciado de las células o un subconjunto de las células de la composición de salida, se reduce en, en aproximadamente, o en al menos un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 %, 99,9 % o en o en aproximadamente un 100 % en comparación con las células de la composición que no se sometieron al método de estimulación a largo plazo. En determinados casos divulgados en el presente documento, la cantidad de células positivas para el marcador asociado con la activación se reduce en una cantidad detectable, estadísticamente significativa en comparación con las células de la composición que no se sometieron al método de estimulación a largo plazo.

En determinados casos divulgados en el presente documento, las células de composiciones de salida, por ejemplo, composiciones de salida o composiciones de control o referencia, que se han sometido al método de estimulación a largo plazo, por ejemplo, una incubación con las partículas, por ejemplo, perlas, que contienen una molécula de unión, muestran un nivel, expresión o cantidad aumentados de células positivas para un marcador, tal como un marcador asociado positivamente con el agotamiento o un marcador asociado positivamente con linfocitos T diferenciados, en comparación con las células de la composición que no se sometieron al método de estimulación a largo plazo. En determinados casos divulgados en el presente documento, la cantidad de células positivas para el marcador, por ejemplo, que tiene una cantidad detectable del marcador o una cantidad o expresión por encima de un nivel umbral o cantidad de tinción, aumenta en, en aproximadamente, o en al menos un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 100 %, 150 %, 200 %, 1 veces, 2 veces, 3 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces o 100 veces en comparación con las células de la composición que no se sometieron al método de estimulación a largo plazo. En determinados casos divulgados en el presente documento, la cantidad de células positivas para el marcador aumenta en una cantidad detectable y estadísticamente significativa en comparación con las células de la composición que no se sometieron al método de estimulación a largo plazo.

En diversos casos divulgados en el presente documento, la expresión, cantidad o nivel promedio, medio o en la mediana de un marcador, tal como un marcador asociado positivamente con el agotamiento o un marcador asociado positivamente con linfocitos T diferenciados, de las células o un subconjunto de las células que se sometieron al método de estimulación a largo plazo aumenta en, en aproximadamente, o en al menos un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 100 %, 150 %, 200 %, 1 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces o 100 veces en comparación con las células de la composición que no se sometieron al método de estimulación a largo plazo. En determinados casos divulgados en el presente documento, la cantidad de células positivas para el marcador asociado positivamente con el agotamiento aumenta en una cantidad detectable, estadísticamente significativa en comparación con las células de la composición que no se sometieron al método de estimulación a largo plazo.

En determinados casos divulgados en el presente documento, una composición celular que contiene células que expresan un receptor recombinante se incuba en presencia de una partícula que contiene una molécula de unión durante entre 7 días y 21 días. En casos particulares divulgados en el presente documento, las células de una composición celular que contiene células que expresan CAR se incuban con partículas, por ejemplo, perlas, que contienen una molécula de unión durante al menos 14 días en ausencia de citocinas recombinantes. En determinados casos divulgados en el presente documento, después del método de estimulación a largo plazo, las células o un subconjunto de las células, por ejemplo, células con CAR+, se evalúan para determinar una actividad estimulada por

antígenos, tal como la producción de citocinas o la actividad citolítica. En casos particulares divulgados en el presente documento, después del ensayo *ex vivo*, las células o un subconjunto de las células de la composición se evalúan para determinar la expresión de uno o más marcadores. En casos particulares divulgados en el presente documento, se comparan dos o más composiciones celulares que se someten al método de estimulación a largo plazo para identificar variaciones o reactivos que mejoren la persistencia, la viabilidad o la actividad de las composiciones celulares cuando se administran a un sujeto *in vivo*.

IV. CÉLULAS GENOMANIPULADAS Y RECEPTORES RECOMBINANTES

En algunos casos divulgados en el presente documento, los métodos divulgados, por ejemplo, para estimular o expandir células que expresan un receptor recombinante, se realizan en una composición de entrada que comprende células que expresan un receptor recombinante y/o en relación con métodos para genomanipular células con un receptor recombinante. En algunos casos divulgados en el presente documento, la genomanipulación de una célula con un receptor recombinante implica poner en contacto una composición de células con una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, un virus o un plásmido no vírico, que contiene un gen que codifica un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR, en condiciones para suministrar la molécula de ácido nucleico a una o más células de la composición.

En algunos casos divulgados en el presente documento, las células incluyen uno o más ácidos nucleicos introducidos mediante ingeniería genética de acuerdo con los métodos divulgados y de este modo expresan productos recombinantes o genomanipulados de dichos ácidos nucleicos. En algunos casos divulgados en el presente documento, 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 genomanipulando y/o en un organismo del que se obtiene dicha célula. En algunos casos divulgados en el presente documento, los ácidos nucleicos no son de origen natural, tal como un ácido nucleico que no se encuentra en la naturaleza, incluyendo uno que comprende combinaciones quiméricas de ácidos nucleicos que codifican diversos dominios de múltiples tipos de células diferentes. En casos particulares divulgados en el presente documento, los ácidos nucleicos contienen un gen que codifica un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR.

En algunos casos divulgados en el presente documento, los métodos divulgados pueden realizarse de manera simultánea, secuencial o concurrente con una o más etapas de procesamiento para fabricar o preparar células genomanipuladas. Las etapas de procesamiento de los métodos pueden incluir una cualquiera o más de varias etapas de procesamiento celular, solas o en combinación. En casos particulares divulgados en el presente documento, las etapas de procesamiento incluyen la transducción o transfección de las células con uno o más ácidos nucleicos, por ejemplo, un polinucleótido heterólogo que comprende un gen que codifica un receptor recombinante. En determinados casos divulgados en el presente documento, las células se transducen con partículas de vector vírico que contienen un vector retrovírico, tal como uno que codifica un producto recombinante para su expresión en las células. En determinados casos divulgados en el presente documento, las células se transfectan con uno o más ácidos nucleicos no víricos, por ejemplo, un plásmido episomal o un transposón. Los métodos pueden incluir además y/o como alternativa otras etapas de procesamiento, tales como etapas para el aislamiento, separación, selección, lavado, suspensión, dilución, concentración y/o formulación de las células. En algunos casos, los métodos también pueden incluir una etapa *ex vivo* para el cultivo, estimulación o expansión de células (por ejemplo, estimulación de las células, por ejemplo, para inducir su proliferación y/o activación), que, en algunos casos, se puede realizar de acuerdo con los métodos divulgados. En algunos casos divulgados en el presente documento, los métodos incluyen aislar células del sujeto, prepararlas, procesarlas, cultivarlas y/o genomanipularlas y reintroducirlas en el mismo sujeto, antes o después de su crioconservación.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el método incluye etapas de procesamiento realizadas en un orden en el cual: las células, por ejemplo, células primarias, se aíslan primero, tal como por selección o separación, de una muestra biológica; las células seleccionadas se incuban con partículas de vector vírico para su transducción; y las células transducidas se formulan en una composición. En algunos casos, las células transducidas se activan, se expanden o se propagan *ex vivo*, tal como mediante estimulación en presencia de un reactivo de estimulación, tal como de acuerdo con los métodos divulgados. En algunos casos divulgados en el presente documento, el método puede incluir una o más etapas de procesamiento entre las que se incluyen lavado, suspensión, dilución y/o concentración de las células, que puede producirse antes de, durante o simultáneamente con o después de una o más de las etapas de aislamiento, tal como separación o selección, transducción, estimulación y/o formulación.

En casos particulares divulgados en el presente documento, las células que se van a transfectar o transducir no se aíslan, no se seleccionan ni se enriquecen antes de ponerlas en contacto con el uno o más ácidos nucleicos. En algunos casos divulgados en el presente documento, las células no se seleccionan antes de ponerlas en contacto con el uno o más ácidos nucleicos. En algunos casos divulgados en el presente documento, las células que se van a transfectar o transducir no se enriquecen antes de ponerlas en contacto con el uno o más ácidos nucleicos.

En algunos casos divulgados en el presente documento, una o más o todas las etapas del procesamiento, por ejemplo, aislamiento, selección y/o enriquecimiento, procesamiento, incubación en relación con las etapas de transducción y

genomanipulación, estimulación y/o activación y formulación se realizan usando un sistema, dispositivo o aparato en un sistema integrado o autónomo, y/o de forma automatizada o programable. En algunos casos divulgados en el presente documento, el sistema o aparato incluye un ordenador y/o un programa informático en comunicación con el sistema o aparato, que permite a un usuario programar, controlar, evaluar el resultado de, y/o ajustar diversos aspectos de las etapas de procesamiento, aislamiento, modificación por ingeniería y formulación. En un caso divulgado en el presente documento, el sistema es un sistema como se describe en la solicitud de patente internacional, Número de publicación WO2009/072003 o US 20110003380 A1. En un caso divulgado en el presente documento, el sistema es un sistema como el descrito en la publicación internacional Número WO2016/073602.

En algunos casos divulgados en el presente documento, una o más de las etapas de procesamiento celular en relación con la preparación, el procesamiento y/o la incubación de las células en relación con el método divulgado, incluso en relación con la preparación de una composición que contenga células genomanipuladas, se pueden realizar en la cavidad interna de una cámara centrífuga, tal como una cámara sustancialmente rígida que generalmente tiene forma cilíndrica y puede girar alrededor de un eje de rotación, que puede aportar determinadas ventajas en comparación con otros métodos disponibles. En algunos casos divulgados en el presente documento, todas las etapas de procesamiento se realizan en la misma cámara centrífuga. En algunos casos divulgados en el presente documento, una o más etapas de procesamiento se realizan en diferentes cámaras centrífugas, tal como múltiples cámaras centrífugas del mismo tipo. Dichos métodos incluyen cualquiera de los descritos en la publicación internacional Número WO2016/073602.

Los ejemplos de cámaras centrífugas de ejemplo incluyen las producidas y comercializadas por Biosafe SA, incluidas las que se usan con el sistema Sepax® y Sepax® 2, incluidas las cámaras centrífugas A-200/F y A-200 y diversos kits para su uso con dichos sistemas. Los ejemplos de cámaras, sistemas e instrumentos de procesamiento y armarios se describen, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. N.º 6.123.655, la Patente de EE. UU. N.º 6.733.433 y la solicitud de patente de EE. UU. publicada, N.º de publicación: US 2008/0171951, y la solicitud de patente internacional publicada, publicación N.º WO 00/38762. Dependiendo del proceso particular (por ejemplo, dilución, lavado, transducción, formulación), está dentro del nivel de un experto en la técnica elegir un kit particular que sea apropiado para el proceso. Los kits de ejemplo para su uso con tales sistemas incluyen, pero sin limitación, kits de un solo uso comercializados por BioSafe SA con los nombres de producto CS-430.1, CS-490.1, CS-600.1 o CS-900.2.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el sistema está incluido con y/o asociado con otros instrumentos, incluidos los instrumentos para operar, automatizar, controlar y/o monitorizar aspectos de las diversas etapas de procesamiento realizadas en el sistema. En algunos casos divulgados en el presente documento esta instrumentación está contenida dentro de un gabinete. En algunos casos divulgados en el presente documento, los instrumentos incluyen un armario, que incluye una carcasa que contiene circuitos de control, una centrífuga, una cubierta, motores, bombas, sensores, pantallas y una interfaz de usuario. Se describe un dispositivo de ejemplo en la Patente de EE. UU. N.º 6.123.655, la Patente de EE. UU. N.º 6.733.433 y el documento US 2008/0171951.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el sistema comprende una serie de recipientes, por ejemplo, bolsas, tubos, llaves de paso, abrazaderas, conectores y una cámara de centrifugado. En algunos casos divulgados en el presente documento, los recipientes, tales como bolsas, incluyen uno o más recipientes, tales como bolsas, que contienen las células que se van a transducir o transfectar y las partículas de vector, por ejemplo, partículas de vectores víricos o plásmidos no víricos, en el mismo recipiente o en recipientes separados, tal como la misma bolsa o bolsas separadas. En algunos casos divulgados en el presente documento, el sistema incluye además uno o más recipientes, tales como bolsas, que contienen medio, tal como diluyente y/o solución de lavado, que se introduce en la cámara y/o en otros componentes para diluir, suspender de nuevo y/o lavar los componentes y/o composiciones durante los métodos. Los recipientes se pueden conectar en una o más posiciones del sistema, tal como en una posición correspondiente a una línea de entrada, línea de diluyente, línea de lavado, línea de residuos y/o línea de salida.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el sistema, tal como un sistema cerrado, es estéril. En algunos casos divulgados en el presente documento, todas las conexiones de los componentes del sistema, tal como entre una línea de tubería y un recipiente a través de un conector, se realizan en condiciones estériles. En algunos casos divulgados en el presente documento, las conexiones se realizan bajo flujo laminar. En algunos casos divulgados en el presente documento, las conexiones se realizan mediante un dispositivo de conexión estéril que produce conexiones estériles, tales como soldaduras estériles, entre un tubo y un recipiente. En algunos casos divulgados en el presente documento, un dispositivo de conexión estéril efectúa la conexión en condiciones térmicas lo suficientemente altas para mantener la esterilidad, tales como temperaturas de al menos 200 °C, tal como al menos 260 °C o 300 °C.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el sistema puede ser desechable, tal como un kit de un solo uso. En algunos casos divulgados en el presente documento, un kit de un solo uso se puede utilizar en una pluralidad de ciclos de un proceso o procesos, tal como al menos 2, 3, 4, 5 o más veces, por ejemplo, en procesos que tienen lugar de manera continua o semicontinua. En algunos casos divulgados en el presente documento, el sistema, tal como un kit de un solo uso, se emplea para procesar células de un solo paciente. En los casos divulgados en el presente documento de los métodos, los procesos no necesitan realizarse en el mismo sistema cerrado, tal como en la misma cámara centrífuga, pero se pueden realizar en un sistema cerrado diferente, tal como en una cámara centrífuga diferente; en algunos casos divulgados en el presente documento, estas cámaras centrífugas diferentes se

encuentran en los puntos respectivos de los métodos colocados en asociación con el mismo sistema, tal como colocados en asociación con la misma centrífuga. En algunos casos divulgados en el presente documento, todas las etapas de procesamiento se realizan en un sistema cerrado, en el que la totalidad o un subconjunto de cada una o más etapas de procesamiento se realiza en la misma cámara centrífuga o en una diferente.

A. Muestras y preparaciones celulares

En el presente documento se divulgan células, incluyendo células genomanipuladas que contienen un receptor recombinante. También se divulgan poblaciones de dichas células y composiciones que contienen dichas células. Entre las composiciones se encuentran composiciones de entrada que contienen células en las que se sabe o es probable que una o más células expresen un receptor recombinante capaz de ser reconocido o unido por una molécula de unión presente en una o más partículas con las que se incuban o entran en contacto las células. También entre las composiciones se encuentran composiciones producidas por los métodos divulgados, incluyendo composiciones de salida en las que se encuentran contenidas células estimuladas o expandidas, incluyendo composiciones enriquecidas para células que contienen un receptor recombinante unido o reconocido por la molécula de unión de la partícula, tales como en el que las células que expresan el receptor recombinante, por ejemplo, un receptor quimérico, constituyen al menos el 50, 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 por ciento o más del total de células en la composición o células de un determinado tipo, tal como linfocitos T o células CD8⁺ o CD4⁺. Por lo tanto, se divulgan células genomanipuladas que expresan los receptores recombinantes, por ejemplo, los CAR.

Entre las composiciones se encuentran composiciones farmacéuticas y formulaciones para administración, tal como para la terapia celular adoptiva. También se divulgan métodos para genomanipular, producir o generar dichas células, métodos terapéuticos para administrar las células y composiciones a sujetos, por ejemplo, pacientes y métodos para detectar, seleccionar, aislar o separar dichas células.

Las células generalmente son células eucariotas, tales como células de mamífero y típicamente son células humanas. En algunos casos divulgados en el presente documento, las células se obtienen de la sangre, médula ósea, linfa u órganos linfoides, son células del sistema inmunitario, tales como células del sistema inmunitario innato o adaptativo, por ejemplo, células mieloides o linfoides, incluyendo linfocitos, típicamente linfocitos T y/o linfocitos NK. Otras células de ejemplo incluyen células madre, tales como las células madre multipotentes y pluripotentes, incluyendo células madre pluripotentes inducidas (iPSC).

Las células típicamente son células primarias, tales como las aisladas directamente de un sujeto y/o las aisladas de un sujeto y congeladas. En algunos casos divulgados en el presente documento, las células incluyen uno o más subconjuntos de linfocitos T u otros tipos de células, tales como poblaciones de linfocitos T completas, células CD4⁺, células CD8⁺ y subpoblaciones de las mismas, tales como las definidas por su función, estado de activación, madurez, potencial de diferenciación, expansión, recirculación, ubicación y/o capacidad de persistencia, especificidad antigénica, tipo de receptor de antígeno, presencia en un órgano o compartimento particular, perfil de marcadores o secreción de citocinas y/o grado de diferenciación. Con referencia al sujeto a tratar, las células pueden ser alogénas y/o autólogas. Entre los métodos se incluyen métodos existentes. En algunos casos divulgados en el presente documento, tales como para tecnologías existentes, las células son pluripotentes y/o multipotentes, tales como células madre, tales como células madre pluripotentes inducidas (iPSC).

Entre los subtipos y subpoblaciones de linfocitos T y/o de linfocitos T CD4⁺ y/o de T CD8⁺ están los linfocitos T indiferenciados (T_N), linfocitos T efectores (T_{EFF}), linfocitos T de memoria y subtipos de los mismos, tales como los linfocitos T madre de memoria (T_{SCM}), linfocitos T de memoria central (T_{CM}), linfocitos T de memoria efectores (T_{EM}), o linfocitos T de memoria efectores diferenciados terminalmente, linfocitos infiltrantes de tumor (TIL), linfocitos T inmaduros, linfocitos T maduros, linfocitos T auxiliares, linfocitos T citotóxicos, linfocitos T invariantes asociados a la mucosa (MAIT), linfocitos T reguladores (Treg) adaptativos y de origen natural, linfocitos T auxiliares, tales como linfocitos TH1, linfocitos TH2, linfocitos TH3, linfocitos TH17, linfocitos TH9, linfocitos TH22, linfocitos T auxiliares foliculares, linfocitos T alfa/beta y linfocitos T delta/gamma.

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

En algunos casos divulgados en el presente documento, las células se obtienen de estirpes celulares, por ejemplo, estirpes de linfocitos T. En algunos casos divulgados en el presente documento, las células se obtienen de una fuente xenogénica, por ejemplo, de ratón, rata, primate no humano y cerdo.

En algunos casos divulgados en el presente documento, las células pueden aislarse de una muestra, tal como una muestra biológica, por ejemplo, una obtenida o procedente de un sujeto. En algunos casos divulgados en el presente documento, el sujeto del que se aísla la célula es uno que tiene la enfermedad o afección o que necesita una terapia celular o al que se le administrará la terapia celular. En algunos casos divulgados en el presente documento, el sujeto es un ser humano que necesita una intervención terapéutica particular, tal como la terapia celular adoptiva para la que las células se aíslan, se procesan y/o se genomanipulan.

Por consiguiente, en algunos casos divulgados en el presente documento, las células son células primarias, por ejemplo, células primarias humanas. Las muestras incluyen tejido, fluido y otras muestras tomadas directamente del sujeto, así como muestras resultantes de una o más etapas de procesamiento, tales como separación, centrifugación, genomanipulación (por ejemplo, transducción con vector vírico), lavado y/o incubación. La muestra biológica puede ser una muestra obtenida directamente de una fuente biológica o una muestra que se procesa. Las muestras biológicas incluyen, pero sin limitación, fluidos corporales, tales como sangre, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, orina y sudor, muestras de tejidos y órganos, incluyendo muestras procesadas obtenidas de los mismos.

En algunos casos divulgados en el presente documento, se obtienen células de la sangre circulante de un sujeto, por ejemplo, mediante aféresis o leucocitaféresis. En determinados casos divulgados en el presente documento, las células sanguíneas contienen linfocitos, incluyendo linfocitos T, monocitos, granulocitos, linfocitos B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y/o plaquetas, y, en algunos casos divulgados en el presente documento, contienen células distintas de glóbulos rojos y plaquetas. En algunos casos divulgados en el presente documento, antes de la selección y/o el enriquecimiento de células, la muestra o las células de la muestra se pueden dejar reposar o retener antes de las etapas de procesamiento posteriores. En algunos casos divulgados en el presente documento, la muestra se mantiene o se conserva a una temperatura de aproximadamente 2 °C a 8 °C durante hasta 48 horas, tal como durante hasta 12 horas, 24 horas o 36 horas. En determinados casos divulgados en el presente documento, las células no se seleccionan y/o ni se enriquecen antes de ponerlas en contacto con el uno o más ácidos nucleicos. En algunos casos divulgados en el presente documento, la muestra o las células se pueden dejar reposar o retener antes de ponerlas en contacto o incubarlas con uno o más ácidos nucleicos. En determinados casos divulgados en el presente documento, la muestra se mantiene o se conserva a una temperatura de aproximadamente 2 °C a 8 °C durante hasta 48 horas, tal como durante hasta 12 horas, 24 horas o 36 horas antes de poner en contacto o incubar las células con uno o más ácidos nucleicos.

En algunos casos divulgados en el presente documento, los métodos de preparación incluyen etapas para congelar, por ejemplo, crioconservar, las células, ya sea antes o después del aislamiento, la selección y/o el enriquecimiento, la incubación para transducción y genomanipulación y/o la estimulación, la activación y/o expansión de células. En algunos casos divulgados en el presente documento, las células se suspenden en una solución de congelación, por ejemplo, después de una etapa de lavado para eliminar el plasma y las plaquetas. En algunos casos divulgados en el presente documento puede usarse cualquiera de una diversidad de soluciones y parámetros de congelación. Un caso divulgado en el presente documento implica el uso de PBS que contiene DMSO al 20 % y seroalbúmina humana (HSA) al 8 %, u otros medios de congelación celular adecuados. A continuación, esto se diluye a 1:1 con medio de manera que la concentración final de DMSO y HSA sea del 10 % y del 4 %, respectivamente. A continuación, las células generalmente se congelan a -80 °C a una velocidad de 1° por minuto y se almacenan en la fase de vapor de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el aislamiento de las células incluye una o más etapas de preparación y/o separación de células no basada en afinidad. En algunos casos divulgados en el presente documento, las células se lavan, se centrifugan y/o se incuban en presencia de uno o más reactivos, por ejemplo, para eliminar componentes no deseados, enriquecer los componentes deseados, causar la lisis celular o eliminar las células sensibles a reactivos particulares. En algunos casos divulgados en el presente documento, las células se separan basándose en una o más propiedades, tales como densidad, propiedades adherentes, tamaño, sensibilidad y/o resistencia a componentes particulares.

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

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

Dichas etapas de separación se pueden basar en selección positiva, en la que las células que se han unido a los reactivos quedan retenidas para su uso posterior, y/o en selección negativa, en la que las células que no se han unido al anticuerpo o compañero de unión se conservan. En algunos casos divulgados en el presente documento, ambas fracciones se conservan para su uso posterior. En algunos casos divulgados en el presente documento, la selección negativa puede ser particularmente útil cuando no hay ningún anticuerpo disponible que identifique específicamente

un tipo de célula en una población heterogénea, de manera que la separación se realiza mejor basándose en marcadores expresados por células distintas de la población deseada.

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

En algunos casos divulgados en el presente documento, se realizan múltiples rondas de etapas de separación, donde la fracción seleccionada positiva o negativamente de una etapa se somete a otra etapa de separación, tal como una selección posterior positiva o negativa. En algunos casos divulgados en el presente documento, una única etapa de separación puede agotar células que expresan múltiples marcadores simultáneamente, tal como incubando las células con una pluralidad de anticuerpos o compañeros de unión, cada uno de ellos específico para un marcador dirigido a la selección negativa. Asimismo, pueden seleccionarse positivamente de manera simultánea múltiples tipos celulares incubando células con una pluralidad de anticuerpos o compañeros de unión expresados en los diversos tipos celulares.

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

Por ejemplo, los linfocitos T CD3⁺, CD28⁺ pueden seleccionarse positivamente usando perlas magnéticas conjugadas con anti CD3/anti CD28 (por ejemplo, DYNABEADS[®] M-450 CD3/CD28 T Cell Expander). En casos particulares divulgados en el presente documento, las células se ponen en contacto con perlas magnéticas conjugadas con anti CD3/anti CD28 (por ejemplo, DYNABEADS[®] M-450 CD3/CD28 T Cell Expander) para expandir linfocitos T CD3⁺, CD28⁺ antes de poner en contacto las células con el uno o más ácidos nucleicos. En determinados casos divulgados en el presente documento, las células no entran en contacto con perlas magnéticas conjugadas con anti CD3/anti CD28 antes de poner en contacto las células con uno o más ácidos nucleicos.

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

En algunos casos divulgados en el presente documento, los linfocitos T se separan de una muestra de PBMC mediante la selección negativa de marcadores expresados en células diferentes de linfocitos T, tales como linfocitos B, monocitos u otros glóbulos blancos, tal como CD14. En algunos casos divulgados en el presente documento, se usa una etapa de selección de CD4⁺ o CD8⁺ para separar linfocitos T CD4⁺ auxiliares y linfocitos T CD8⁺ citotóxicos. Dichas poblaciones de CD4⁺ y CD8⁺ se pueden clasificar además en subpoblaciones mediante selección positiva o negativa para marcadores expresados o expresados en un grado relativamente más alto en una o más subpoblaciones de linfocitos T indiferenciados, de memoria y/o efectores.

En algunos casos divulgados en el presente documento, las células CD8⁺ se enriquecen aún más o se eliminan de ellas células madre indiferenciadas, de memoria central, de memoria efectoras y/o células madre de memoria central, tal como mediante selección positiva o negativa basándose en antígenos de superficie asociados a la subpoblación respectiva. En algunos casos divulgados en el presente documento, el enriquecimiento de los linfocitos T de memoria central (T_{CM}) se realiza para aumentar la eficacia, tal como para mejorar la supervivencia a largo plazo, la expansión y/o el injerto después de la administración, que en algunos casos divulgados en el presente documento es particularmente fuerte en tales subpoblaciones. Véanse Terakura *et al.* (2012) Blood. 1:72-82; Wang *et al.* (2012) J Immunother. 35(9):689-701. En algunos casos divulgados en el presente documento, la combinación de linfocitos T CD8⁺ y linfocitos T CD4⁺ enriquecidos con T_{CM} mejora adicionalmente la eficacia.

En los casos divulgados en el presente documento, los linfocitos T de memoria están presentes en los subconjuntos CD62L⁺ y CD62L⁻ de linfocitos CD8⁺ de sangre periférica. Las PBMC se pueden enriquecer o agotar en las fracciones CD62L⁻CD8⁺ y/o CD62L⁺CD8⁺, tal como mediante el uso de anticuerpos anti CD8 y anti CD62L.

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

aislamiento de una población de CD8⁺ enriquecida de linfocitos T_{CM} se realiza mediante el agotamiento de las células que expresan CD4, CD14, CD45RA, y la selección positiva o el enriquecimiento en células que expresan CD62L. En un caso divulgado en el presente documento, el enriquecimiento de linfocitos T de memoria central (T_{CM}) se realiza a partir de una fracción negativa de células seleccionadas en función de la expresión de CD4, que se somete a una selección negativa basada en la expresión de CD14 y CD45RA, y una selección positiva basada en CD62L. En algunos casos divulgados en el presente documento, dichas selecciones se realizan simultáneamente y en otros casos divulgados en el presente documento se realizan secuencialmente, en cualquier orden. En algunos casos divulgados en el presente documento, la misma etapa de selección basada en la expresión de CD4 usada en la preparación de la población o subpoblación de células CD8⁺, también se usa para generar la población o subpoblación de células CD4⁺, de manera que tanto las fracciones positivas como las negativas de la separación basada en CD4 se conserven y se usen en las etapas posteriores de los métodos, opcionalmente después de una o más etapas de selección positiva o negativa adicionales.

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

Los linfocitos T CD4⁺ auxiliares se clasifican en células indiferenciadas, de memoria central y efectoras mediante la identificación de poblaciones celulares que tienen antígenos de superficie celular. Los linfocitos CD4⁺ se pueden obtener mediante métodos convencionales. En algunos casos divulgados en el presente documento, los linfocitos T CD4⁺ indiferenciados son linfocitos T CD45RO⁻, CD45RA⁺, CD62L⁺ y CD4⁺. En algunos casos divulgados en el presente documento, las células CD4⁺ de memoria central pueden ser CD62L⁺ y CD45RO⁺. En algunos casos divulgados en el presente documento, las células CD4⁺ efectoras son CD62L⁻ y CD45RO⁻.

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

En algunos casos divulgados en el presente documento, la muestra o composición de células a separar se incuba con material pequeño, magnetizable o magnéticamente sensible, tal como partículas o micropartículas magnéticamente sensibles, tales como perlas paramagnéticas (por ejemplo, perlas Dynabeads o MACS). El material magnéticamente sensible, por ejemplo, la 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 desean separar, por ejemplo, que se desea seleccionar negativa o positivamente.

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

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

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

En determinados casos divulgados en el presente documento, las partículas magnéticamente sensibles están recubiertas de anticuerpos primarios u otros compañeros de unión, anticuerpos secundarios, lectinas, enzimas o

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

En algunos casos divulgados en el presente documento, las partículas magnéticamente sensibles se dejan unidas a las células que posteriormente han de incubarse, cultivarse y/o genomanipularse; en algunos casos divulgados en el presente documento, las partículas se dejan adheridas a las células para su administración a un paciente. En algunos casos divulgados en el presente documento, 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 enlazadores escindibles. En algunos casos divulgados en el presente documento, las partículas magnetizables son biodegradables.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la selección basada en afinidad se realiza mediante clasificación celular activada magnéticamente (MACS) (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Los sistemas de clasificación celular activada magnéticamente (MACS) son capaces de realizar una selección de alta pureza de células que tienen partículas magnetizadas unidas a las mismas. En determinados casos divulgados en el presente documento, la MACS funciona en un modo en donde las especies no diana y diana específicas se eluyen de manera secuencial después de la aplicación del campo magnético externo. Es decir, las células adheridas a las partículas magnetizadas se mantienen en su lugar mientras eluyen las especies no adheridas. A continuación, tras completar esta primera etapa de elución, las especies que quedaron atrapadas en el campo magnético y se impidió que eluyesen, se liberan de alguna manera, de modo que pueden eluirse y recuperarse. En determinados casos divulgados en el presente documento, las células no diana se marcan y la población heterogénea de células se agota de las mismas.

En determinados casos divulgados en el presente documento, el aislamiento o la separación se realiza usando un sistema, dispositivo o aparato que realiza una o más de las etapas de aislamiento, preparación celular, separación, procesamiento, incubación, cultivo y/o formulación de los métodos. En algunos casos divulgados en el presente documento, el sistema se usa para realizar cada una de estas etapas en un entorno cerrado o aséptico, por ejemplo, para minimizar el error, la manipulación del usuario y/o la contaminación. En un caso divulgado en el presente documento, el sistema es un sistema como se describe en la solicitud de patente internacional, Número de publicación WO2009/072003 o US 20110003380 A1. En un caso divulgado en el presente documento, el sistema es un sistema como el descrito en la publicación internacional Número WO2016/073602.

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

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

En determinados casos divulgados en el presente documento, la separación y/u otras etapas se realizan usando el sistema CliniMACS Prodigy (Miltenyi Biotec). En algunos casos divulgados en el presente documento, el sistema CliniMACS Prodigy está equipado con una unidad de procesamiento de células que permite el lavado y el fraccionamiento automatizados de las células por centrifugación. El sistema CliniMACS Prodigy también puede incluir

una cámara integrada y un programa informático de reconocimiento de imágenes que determina el criterio de valoración de fraccionamiento celular óptimo al discernir las capas macroscópicas del producto de la célula fuente. 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 tales como, por ejemplo, diferenciación y expansión celulares, carga de antígeno y cultivo celular a largo plazo. Los puertos de entrada pueden permitir la eliminación aséptica y el reabastecimiento de los medios y las células pueden controlarse usando un microscopio integrado. Véanse, por ejemplo, Klebanoff *et al.* (2012) *J Immunother.* 35(9): 651-660, Terakura *et al.* (2012) *Blood.* 1:72-82 y Wang *et al.* (2012) *J Immunother.* 35(9):689-701.

En algunos casos divulgados en el presente documento, una población celular descrita en el presente documento se recoge y enriquece (o agota) a través de citometría de flujo, en la que las células teñidas con respecto a múltiples marcadores de superficie celular se transportan en una corriente fluida. En algunos casos divulgados en el presente documento, una población celular descrita en el presente documento se recoge y enriquece (o agota) mediante clasificación a escala preparativa (FACS). En determinados casos divulgados en el presente documento, una población celular descrita en el presente documento se recoge y enriquece (o agota) usando microplacas de sistemas microelectromecánicos (SMEM) junto con un sistema de detección basado en FACS (véanse, por ejemplo, el documento WO 2010/033140, Cho *et al.* (2010) *Lab Chip* 10, 1567-1573; y Godin *et al.* (2008) *J Biophoton.* 1(5):355-376. En ambos casos, las células pueden marcarse con múltiples marcadores, lo que permite el aislamiento de subconjuntos de linfocitos T bien definidos con alta pureza.

En algunos casos divulgados en el presente documento, los anticuerpos o compañeros de unión se marcan con uno o más marcadores detectables, para facilitar la separación mediante selección positiva y/o negativa. Por ejemplo, la separación puede basarse en la unión a anticuerpos marcados con fluorescencia. En algunos casos divulgados en el presente documento, 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 por clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), incluyendo clasificación a escala preparativa (FACS) y/o microplacas de sistemas microelectromecánicos (MEMS), por ejemplo, junto con un sistema de detección por citometría de flujo. Dichos métodos permiten la selección positiva y negativa basada en múltiples marcadores simultáneamente.

En algunos casos divulgados en el presente documento, las células se activan o estimulan antes de una o más etapas para genomanipular las células, por ejemplo, mediante la transducción o transfección de las células. En casos particulares divulgados en el presente documento, las células se cultivan o se incuban en condiciones estimuladoras antes de una o más etapas para genomanipular las células. En algunos casos divulgados en el presente documento, las condiciones o agentes estimuladores incluyen uno o más agentes, por ejemplo, ligandos, capaces de activar un dominio de señalización intracelular de un complejo TCR. En algunos casos divulgados en el presente documento, el agente activa o inicia la cascada de señalización intracelular de TCR/CD3 en un linfocito T. Dichos agentes pueden incluir anticuerpos, tales como los específicos para un TCR, por ejemplo, anti CD3. En algunos casos divulgados en el presente documento, las condiciones de estimulación incluyen uno o más agentes, por ejemplo, un ligando, que es capaz de estimular a un receptor coestimulador, por ejemplo, anti CD28. En algunos casos divulgados en el presente documento, dichos agentes y/o ligandos pueden estar unidos a un soporte sólido tal como una perla, y/o una o más citocinas. Opcionalmente, la activación o estimulación puede comprender además la etapa de añadir anticuerpo anti CD3 y/o anti CD28 al medio de cultivo (por ejemplo, a una concentración de al menos aproximadamente 0,5 ng/ml). En algunos casos divulgados en el presente documento, los agentes estimuladores incluyen IL-2, IL-15 y/o IL-7. En algunos casos divulgados en el presente documento, la concentración de IL-2 es de al menos aproximadamente 10 unidades/ml.

B. Ácido nucleico que codifica una proteína heteróloga

También se divulgan uno o más polinucleótidos (por ejemplo, moléculas de ácido nucleico) que codifican receptores recombinantes, vectores para genomanipular células que expresen dichos receptores y métodos para producir las células genomanipuladas. En algunos casos divulgados en el presente documento, el vector contiene el ácido nucleico que codifica el receptor recombinante. En casos particulares divulgados en el presente documento, el vector es un vector vírico o un vector no vírico. En algunos casos, el vector es un vector vírico, tal como un vector retrovírico, por ejemplo, un vector lentivírico o un vector gammaretrovírico.

En algunos casos divulgados en el presente documento, las células se ponen en contacto con el vector sin activación previa de las células y/o dentro de un período de tiempo que se inicia no más de 24 horas después de obtener las células de un sujeto y/o en el que las células no se han sometido a una temperatura mayor de 15 °C a 25 °C, tal como mayor de o mayor de aproximadamente para más de 37 °C $\pm$ 2,0 °C, durante no más de 24 horas después de que las células se obtienen de un sujeto. En determinados casos divulgados en el presente documento, el vector se pone en contacto con las células sin primero, es decir, antes de la genomanipulación (por ejemplo, transducción o transfección), activar y/o estimular los linfocitos T con un reactivo de estimulación *ex vivo* (por ejemplo, reactivo anti CD3/anti CD28) antes y/o junto con la puesta en contacto o la incubación de las células con las partículas víricas. En algunos casos divulgados en el presente documento, los vectores incluyen vectores víricos, por ejemplo, vectores retrovíricos o lentivíricos, no víricos o transposones, por ejemplo, el sistema de transposón *Bella Durmiente*, vectores procedentes

del virus del simio 40 (SV40), adenovirus, virus adenoasociado (AAV), vectores lentivíricos o vectores retrovíricos, tales como vectores gammaretrovíricos, un vector retrovírico procedente 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 murinas (MSCV), virus formador de focos en el bazo (SFFV) o virus adenoasociado (AAV).

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

En algunos casos divulgados en el presente documento, el vector vírico o el ADN no vírico contiene un ácido nucleico que codifica un receptor recombinante y/o un receptor quimérico, tal como una proteína receptora heteróloga. El receptor recombinante, tal como el receptor heterólogo, puede incluir receptores de antígeno, tales como receptores de antígenos funcionales no TCR, incluyendo receptores de antígeno quiméricos (CAR) y otros receptores de unión a antígeno, tales como los receptores transgénicos de linfocitos T (TCR). Los receptores también pueden incluir otros receptores, tales como otros receptores quiméricos, tales como receptores que se unen a ligandos particulares y que tienen dominios de señalización transmembrana y/o intracelular similares a los presentes en un CAR.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el ácido nucleico se inserta o se ubica en una región de un vector vírico, tal como generalmente en una región no esencial del genoma vírico. En algunos casos divulgados en el presente documento, el ácido nucleico se inserta en el genoma vírico en lugar de determinadas secuencias víricas para producir un virus que es defectuoso en la replicación. En determinados casos divulgados en el presente documento, el ácido nucleico se ubica dentro de un ADN no vírico, por ejemplo, dentro de un transposón.

Los receptores de antígenos, incluyendo los CAR y los TCR recombinantes, y la producción e introducción de los mismos, en algunos casos divulgados en el presente documento incluyen los descritos, por ejemplo, en las publicaciones de solicitud de patente internacional número WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061, las publicaciones de solicitudes de patente de EE. UU. n.º US2002131960, US2013287748, US20130149337, las Patentes de EE. UU. N.º: 6.451.995, 7.446.190, 8.252.592, 8.339.645, 8.398.282, 7.446.179, 6.410.319, 7.070.995, 7.265.209, 7.354.762, 7.446.191, 8.324.353 y 8.479.118, y la solicitud de patente europea número EP2537416, y/o los descritos por Sadelain *et al.*, Cancer Discov. abril de 2013; 3(4): 388-398; Davila *et al.* (2013) PLoS ONE 8(4): e61338; Turtle *et al.*, Curr. Opin. Immunol., octubre de 2012; 24(5): 633-39; Wu *et al.*, Cancer, marzo de 2012 18(2): 160-75.

1. Receptores de antígeno quimérico

En algunos casos divulgados en el presente documento, se divulgan células genomanipuladas, tales como linfocitos T, que expresan un CAR con especificidad para un antígeno particular (o marcador o ligando), tal como un antígeno expresado en la superficie de un tipo celular particular. En algunos casos divulgados en el presente documento, el antígeno es un polipéptido. En algunos casos divulgados en el presente documento, es un hidrato de carbono u otra molécula. En algunos casos divulgados en el presente documento, el antígeno se expresa o se sobreexpresa selectivamente en células de la enfermedad o afección, por ejemplo, las células tumorales o patógenas, en comparación con células o tejidos normales o no diana. En otros casos divulgados en el presente documento, el antígeno se expresa en células normales y/o se expresa en las células genomanipuladas.

En casos particulares divulgados en el presente documento, el receptor recombinante, tal como un receptor quimérico, contiene una región de señalización intracelular, que incluye un dominio de señalización citoplasmática (también denominado indistintamente dominio de señalización intracelular), tal como una región citoplasmática (intracelular) capaz de inducir una señal de activación primaria en un linfocito T, por ejemplo, un dominio de señalización citoplasmática de un componente del receptor de linfocitos T (TCR) (por ejemplo, un dominio de señalización citoplasmática de una cadena zeta de una cadena CD3-zeta (CD3ζ) o una variante funcional o porción de señalización de la misma) y/o que comprende un motivo de activación inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM).

En algunos casos divulgados en el presente documento, 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 divulgados en el presente documento, 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 divulgados en el presente documento, el ligando, tal como un antígeno, es una proteína que se expresa en la superficie de las células. En algunos casos divulgados en el presente documento, el CAR es un CAR de tipo TCR y el antígeno es un antígeno peptídico procesado, tal como un antígeno peptídico de una proteína intracelular, que, al igual que un TCR, es reconocido en la superficie celular en el contexto de una molécula del complejo principal de histocompatibilidad (MHC).

Los receptores de antígenos de ejemplo, incluyendo los CAR, y los métodos para genomanipular e introducir dichos receptores en las células, incluyen los descritos, por ejemplo, en las publicaciones de solicitud de patente internacional

número WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061, las publicaciones de solicitudes de patente de EE. UU. n.º US2002131960, US2013287748, US20130149337, las Patentes de EE. UU. N.º: 6.451.995, 7.446.190, 8.252.592, 8.339.645, 8.398.282, 7.446.179, 6.410.319, 7.070.995, 7.265.209, 7.354.762, 7.446.191, 8.324.353 y 8.479.118, y en la solicitud de patente europea número EP2537416, y/o en las descritas por Sadelain *et al.*, Cancer Discov. abril de 2013; 3(4): 388-398; Davila *et al.* (2013) PLoS ONE 8(4): e61338; Turtle *et al.*, Curr. Opin. Immunol., octubre de 2012; 24(5): 633-39; Wu *et al.*, Cancer, marzo de 2012 18(2): 160-75. En algunos casos divulgados en el presente documento, los receptores de antígeno 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. Como ejemplos de los CAR incluyen los CAR que se divulgan en cualquiera de las publicaciones mencionadas anteriormente, tales como los documentos WO2014031687, US 8.339.645, US 7.446.179, US 2013/0149337, la Patente de EE. UU. N.º: 7.446.190, la Patente de EE. UU. N.º: 8.389.282, Kochenderfer *et al.*, 2013, Nature Reviews Clinical Oncology, 10, 267-276 (2013); Wang *et al.* (2012) J. Immunother. 35(9): 689-701; y Brentjens *et al.*, Sci Transl Med. 2013 5(177). Véanse también los documentos WO2014031687, US 8.339.645, US 7.446.179, US 2013/0149337, la Patente de EE. UU. N.º: 7.446.190 y la Patente de EE. UU. N.º: 8.389.282.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el CAR se construye con una especificidad por un antígeno (o marcador o ligando) particular, 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 previsto para inducir una respuesta amortiguadora, tal como un antígeno expresado en un tipo de célula normal o no enferma. Por lo tanto, el CAR incluye típicamente en su porción extracelular una o más moléculas de unión a antígeno, tales como uno o más fragmentos de unión a antígeno, dominio, o porción, o uno o más dominios variables de anticuerpo, y/o moléculas de anticuerpo. En algunos casos divulgados en el presente documento, el CAR incluye una porción de unión a antígeno o porciones de una molécula de anticuerpo, tal como un fragmento de anticuerpo monocatenario (scFv) que proviene de las cadenas pesada variable (VH) y ligera variable (VL) de un anticuerpo monoclonal (mAb).

En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo se expresa en células como parte de un receptor recombinante, tal como un receptor de antígeno. Entre los receptores de antígenos se encuentran los receptores funcionales de antígenos no TCR, tal como los receptores de antígenos quiméricos (CAR). Generalmente, un CAR que contiene un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno que presenta una especificidad similar al TCR dirigida contra complejos péptido-MHC, también puede denominarse CAR similar al TCR. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio de unión a antígeno extracelular específico para un complejo MHC-péptido de un CAR de tipo TCR, está unido a uno o más componentes de señalización intracelular, en algunos casos divulgados en el presente documento a través de enlazadores y/o uno o más dominios transmembrana. En algunos casos divulgados en el presente documento, dichas moléculas típicamente imitan o se aproximan a una señal a través de un receptor de antígeno natural, tal como un TCR, y, opcionalmente, una señal a través de dicho receptor junto con un receptor coestimulador.

En algunos casos divulgados en el presente documento, 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 un ligando). Entre los antígenos dirigidos por los receptores quiméricos se encuentran los expresados en el contexto de una enfermedad, afección o tipo de célula a la que se dirigirá a través de la terapia celular adoptiva. Entre las enfermedades y afecciones se encuentran enfermedades y trastornos proliferativos, neoplásicos y neoplásicos, incluyendo cánceres y tumores, incluyendo cánceres hemáticos, cánceres del sistema inmunitario, tales como linfomas, leucemias y/o mielomas, tales como leucemias de linfocitos B, T y mieloides, linfomas y mielomas múltiples.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el antígeno (o un ligando) es un polipéptido. En algunos casos divulgados en el presente documento, es un hidrato de carbono u otra molécula. En algunos casos divulgados en el presente documento, el antígeno (o un ligando) se expresa o se sobreexpresa selectivamente en las células de la enfermedad o afección, por ejemplo, las células tumorales o patógenas, en comparación con células o tejidos normales o no diana. En otros casos divulgados en el presente documento, el antígeno se expresa en células normales y/o se expresa en las células genomanipuladas.

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

En algunos casos divulgados en el presente documento, el antígeno es o incluye la integrina $\alpha\text{v}\beta 6$ (integrina $\alpha\text{v}\beta 6$), antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA), B7-H3, B7-H6, anhidrasa carbónica 9 (CA9, también conocida como CAIX o G250), un antígeno del cáncer de testículo, antígeno 1B de cáncer/testículo (CTAG, también conocido como NY-ESO-1 y LAGE-2), antígeno carcinoembrionario (CEA), una ciclina, ciclina A2, ligando 1 de quimiocinas con motivo C-C (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, condroitín sulfato proteoglicano 4 (CSPG4), proteína del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), mutación del receptor del factor de crecimiento epidérmico de tipo III (EGFR vIII), glucoproteína 2 epitelial (EPG-2), glucoproteína 40 epitelial (EPG-40), efrina B2, receptor de efrina A2 (EPHa2), receptor de estrógenos, receptor Fc de tipo 5 (FCRL5); también conocido como receptor Fc homólogo 5 o FCRH5), receptor de acetilcolina fetal (AChR fetal),

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

En algunos casos divulgados en el presente documento, el antígeno es un antígeno específico del patógeno. En algunos casos divulgados en el presente documento, el antígeno es un antígeno vírico (tal como un antígeno vírico del VIH, VHC, VHB, etc.), antígenos bacterianos y/o antígenos parasitarios.

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

La referencia al "complejo principal de histocompatibilidad" (CMH) se refiere a una proteína, generalmente una glucoproteína, que contiene un sitio de unión o surco de unión peptídico polimorfo que puede, en algunos casos, formar un complejo con antígenos peptídicos de polipéptidos, incluidos los antígenos peptídicos procesados por la maquinaria celular. En algunos casos, las moléculas del MHC pueden mostrarse o expresarse en la superficie celular, incluido como complejo con péptido, es decir, complejo MHC-péptido, para la presentación de un antígeno en una conformación reconocible por un receptor de antígeno en los linfocitos T, tal como un TCR o un anticuerpo de tipo TCR. Generalmente, las moléculas del MHC de clase I son heterodímeros que tienen una cadena α que atraviesa la membrana, en algunos casos con tres dominios α , y una microglobulina β 2 asociada no covalentemente. Generalmente, las moléculas del MHC de clase II están compuestas por dos glucoproteínas transmembrana, α y β , ambas de las cuales típicamente atraviesan la membrana. Una molécula del MHC puede incluir una porción eficaz de un MHC que contenga un sitio o sitios de unión a antígeno para unir un péptido y las secuencias necesarias para el reconocimiento por el receptor de antígeno apropiado. En algunos casos divulgados en el presente documento, las moléculas del MHC de clase I suministran péptidos, que se originan en el citosol, a la superficie celular, donde un complejo MHC-péptido es reconocido por los linfocitos T, tal como generalmente linfocitos T CD8⁺, aunque, en algunos casos, linfocitos T CD4⁺. En algunos casos divulgados en el presente documento, las moléculas del MHC de clase II suministran péptidos, que se originan en el sistema vesicular, a la superficie celular, donde son reconocidos típicamente por linfocitos T CD4⁺. Generalmente, un grupo de locus relacionados codifica las moléculas del MHC, que en conjunto recibe el nombre de H-2 en el ratón y antígeno leucocitario humano (HLA) en el ser humano. Por lo tanto, típicamente el MHC humano también se puede denominar antígeno leucocitario humano (HLA).

La expresión "complejo MHC-péptido" o "complejo péptido-MHC" o variaciones de la misma, se refiere a un complejo o asociación de un antígeno peptídico y una molécula del MHC, tal como, generalmente, mediante interacciones no covalentes del péptido en el surco o hendidura de unión de la molécula del MHC. En algunos casos divulgados en el presente documento, el complejo MHC-péptido está presente o se muestra en la superficie de las células. En algunos casos divulgados en el presente documento, el complejo MHC-péptido puede ser reconocido específicamente por un receptor de antígeno, tal como un TCR, un CAR de tipo TCR o porciones de unión a antígeno de los mismos.

En algunos casos divulgados en el presente documento, un péptido, tal como un antígeno o epítipo peptídico, de un polipéptido puede asociarse a una molécula del MHC, tal como para el reconocimiento por un receptor de antígeno.

Generalmente, el péptido procede de, o se basa en, un fragmento de una molécula biológica más larga, tal como un polipéptido o una proteína. En algunos casos divulgados en el presente documento, típicamente el péptido tiene una longitud de aproximadamente 8 a aproximadamente 24 aminoácidos. En algunos casos divulgados en el presente documento, un péptido tiene una longitud de, o de aproximadamente, 9 a 22 aminoácidos para el reconocimiento en el complejo del MHC de Clase II. En algunos casos divulgados en el presente documento, un péptido tiene una longitud de, o de aproximadamente, 8 a 13 aminoácidos para el reconocimiento en el complejo del MHC de Clase I. En algunos casos divulgados en el presente documento, después del reconocimiento del péptido en el contexto de una molécula del MHC, tal como el complejo MHC-péptido, el receptor de antígeno, tal como el TCR o el CAR de tipo TCR, produce o desencadena una señal de activación del linfocito T que induce una respuesta de linfocitos T, tal como la proliferación de linfocitos T, la producción de citocinas, una respuesta de linfocitos T citotóxicos u otra respuesta.

En algunos casos divulgados en el presente documento, un anticuerpo de tipo TCR o una porción de unión a antígeno, se conocen o se pueden producir mediante métodos conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, las solicitudes de EE. UU. publicadas N.º US 2002/0150914; US 2003/0223994; US 2004/0191260; US 2006/0034850; US 2007/00992530; US20090226474; US20090304679; y la publicación PCT internacional N.º WO 03/068201).

En algunos casos divulgados en el presente documento, un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un complejo MHC-péptido, puede producirse inmunizando a un hospedador con una cantidad eficaz de un inmunógeno que contenga 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 más adelante. En algunos casos divulgados en el presente documento, a continuación se administra una cantidad eficaz del inmunógeno a un hospedador para suscitar una respuesta inmunitaria, en donde el inmunógeno conserva una forma tridimensional del mismo durante un periodo de tiempo suficiente para suscitar una respuesta inmunitaria contra la presentación tridimensional del péptido en el surco de unión de la molécula del MHC. A continuación, se ensaya el suero recogido del hospedador para determinar si se están produciendo los anticuerpos deseados que reconocen una presentación tridimensional del péptido en el surco de unión de la molécula del MHC. En algunos casos divulgados en el presente documento, los anticuerpos producidos se pueden evaluar para confirmar que el anticuerpo puede diferenciar el complejo MHC-péptido de la molécula del MHC en solitario, el péptido de interés en solitario y un complejo de MHC y péptido irrelevante. A continuación, los anticuerpos deseados se pueden aislar.

En algunos casos divulgados en el presente documento, puede producirse un anticuerpo o una porción 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 fagotecas de anticuerpos. En algunos casos divulgados en el presente documento, se pueden generar bibliotecas de presentación en fagos de Fab mutantes, scFv u otras formas de anticuerpos, por ejemplo, en las que los miembros de la biblioteca están mutados en uno o más restos de una o más CDR. Véanse, por ejemplo, la solicitud de EE. UU. publicada N.º US20020150914, el documento US2014/0294841; y Cohen CJ. *et al.* (2003) J Mol. Recogn. 16:324-332.

En el presente documento, el término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio e incluye anticuerpos policlonales y monoclonales, incluyendo anticuerpos inalterados y fragmentos de anticuerpos (de unión a antígeno) funcionales, incluyendo fragmentos de unión a antígeno (Fab), fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fab', fragmentos Fv, fragmentos de IgG recombinante (rIgG), regiones de cadena pesada variable (V_H) capaces de unirse específicamente al antígeno, fragmentos de anticuerpos monocatenarios, incluyendo fragmentos variables monocatenarios (scFv) y fragmentos de anticuerpos de dominio único (por ejemplo, sdAb, sdFv, nanocuerpo). El término abarca formas de inmunoglobulinas genomanipuladas y/o modificadas de otro modo, tales como intracuerpos, pepticuerpos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos completamente humanos, anticuerpos humanizados y anticuerpos heteroconjugados, multiespecíficos, por ejemplo, biespecíficos, anticuerpos, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos, di-scFv en tándem, tri-scFv en tándem. A menos que se indique lo contrario, debe entenderse que el término "anticuerpo" abarca fragmentos de anticuerpos funcionales del mismo. El término también abarca anticuerpos inalterados o de longitud completa, incluyendo anticuerpos de cualquier clase o subclase, incluyendo IgG y subclases de la misma, IgM, IgE, IgA e IgD.

En algunos casos divulgados en el presente documento, las proteínas de unión a antígeno, los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, reconocen específicamente un antígeno de un anticuerpo de longitud completa. En algunos casos divulgados en el presente documento, las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo pueden ser de longitud completa o pueden ser una porción de unión a antígeno (un Fab, F(ab')₂, Fv o un Fv monocatenario (scFv)). En otros casos divulgados en el presente documento, la región constante de cadena pesada del anticuerpo se elige de, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD e IgE, particularmente se elige de, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4, más particularmente, IgG1 (por ejemplo, IgG1 humana). En otro caso divulgado en el presente documento, la región constante de cadena ligera del anticuerpo se elige de, por ejemplo, kappa o lambda, particularmente kappa.

Entre los anticuerpos divulgados se encuentran fragmentos de anticuerpo. Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo inalterado que comprende una porción de un anticuerpo inalterado que se une a un antígeno al que se une el anticuerpo inalterado. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, diacuerpos; anticuerpos lineales; regiones de cadena pesada variable (V_H),

moléculas de anticuerpos monocatenarios tales como scFv y anticuerpos sencillos de un solo dominio V_H ; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. En casos particulares divulgados en el presente documento, los anticuerpos son fragmentos de anticuerpos monocatenarios que comprenden una región de cadena pesada variable y/o una región de cadena ligera variable, tal como scFv.

La expresión "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que está implicada en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera (V_H y V_L , respectivamente) de un anticuerpo natural tienen generalmente estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones marco conservadas (FR) y tres CDR. (Véanse, por ejemplo, Kindt *et al.* Kuby Immunology, 6.^a ed., W. H. Freeman and Co., página 91 (2007). Un solo dominio V_H o V_L puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Además, los anticuerpos que se unen a un antígeno particular pueden aislarse usando un dominio V_H o V_L de un anticuerpo que se une al antígeno para cribar una biblioteca de dominios V_L o V_H complementarios, respectivamente. Véanse, por ejemplo, Portolano *et al.*, J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson *et al.*, Nature 352:624-628 (1991).

Los anticuerpos de un solo dominio son fragmentos de anticuerpo que comprenden la totalidad o una porción del dominio variable de cadena pesada o la totalidad o una porción del dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo. En determinados casos divulgados en el presente documento, un anticuerpo de un solo dominio es un anticuerpo humano de un solo dominio. En algunos casos divulgados en el presente documento, el CAR comprende un dominio de cadena pesada de anticuerpo que se une específicamente al antígeno, tal como un marcador de cáncer o un antígeno de superficie celular de una célula o enfermedad a la que se dirige, tal como una célula tumoral o una célula neoplásica, tal como cualquiera de los antígenos diana descritos en el presente documento o conocidos en la técnica.

Los fragmentos de anticuerpo pueden prepararse mediante diversas técnicas, incluyendo, pero sin limitación, la digestión proteolítica de un anticuerpo inalterado, así como la producción por células hospedadoras recombinantes. En algunos casos divulgados en el presente documento, los anticuerpos son fragmentos producidos de forma recombinante, tales como fragmentos que comprenden disposiciones que no se dan de manera natural, tales como aquellos con dos o más regiones de anticuerpos o cadenas unidas por enlazadores sintéticos, por ejemplo, enlazadores peptídicos y/o que pueden no producirse por digestión enzimática de un anticuerpo inalterado de origen natural. En algunos casos divulgados en el presente documento, los fragmentos de anticuerpos son scFv.

Un anticuerpo "humanizado" es un anticuerpo en el que todos o sustancialmente todos los restos de aminoácidos de la CDR provienen de CDR no humanas y todos o sustancialmente todos los restos de aminoácidos de la FR provienen de FR humanas. Un anticuerpo humanizado puede incluir opcionalmente al menos una porción de una región constante de anticuerpo que procede 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, típicamente para reducir la inmunogenicidad en seres humanos, a la vez que se conserva la especificidad y la afinidad del anticuerpo no humano precursor. En algunos casos divulgados en el presente documento, algunos residuos de FR en un anticuerpo humanizado se sustituyen por residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que proceden los residuos de la CDR), por ejemplo, para restablecer o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

Por lo tanto, en algunos casos divulgados en el presente documento, el receptor de antígeno quimérico, incluyendo los CAR de tipo TCR, incluye una porción extracelular que contiene un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. En algunos casos divulgados en el presente documento, el anticuerpo o fragmento incluye un scFv. En algunos casos divulgados en el presente documento, el receptor de antígeno quimérico incluye una porción extracelular que contiene el anticuerpo o fragmento y una región de señalización intracelular. En algunos casos divulgados en el presente documento, la región de señalización intracelular comprende un dominio de señalización intracelular. En algunos casos divulgados en el presente documento, 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 un linfocito T, un dominio de señalización de un componente del receptor de linfocitos T (TCR), y/o un dominio de señalización que comprende un motivo de activación inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM).

En algunos casos divulgados en el presente documento, el receptor recombinante tal como el CAR, tal como la porción de anticuerpo del mismo, además incluye un espaciador, que puede ser o incluir al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina o una 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 Fc. En algunos casos divulgados en el presente documento, el receptor recombinante comprende además un espaciador y/o una región bisagra. En algunos casos divulgados en el presente documento, la región o porción constante es de una IgG humana, tal como IgG4 o IgG1. En algunos casos divulgados en el presente documento, la porción de la región constante sirve como una región espaciadora entre el componente de reconocimiento de antígeno, por ejemplo, scFv y 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 en ausencia del espaciador. En algunos casos divulgados en el presente documento, el espaciador tiene o tiene aproximadamente 12 aminoácidos de longitud o no tiene más de 12 aminoácidos de longitud. Los espaciadores de ejemplo incluyen los que tienen al menos de aproximadamente 10 a 229 aminoácidos, de aproximadamente 10 a 200 aminoácidos, de aproximadamente 10 a 175 aminoácidos, de

aproximadamente 10 a 150 aminoácidos, de aproximadamente 10 a 125 aminoácidos, de aproximadamente 10 a 100 aminoácidos, de aproximadamente 10 a 75 aminoácidos, de aproximadamente 10 a 50 aminoácidos, de aproximadamente 10 a 40 aminoácidos, de aproximadamente 10 a 30 aminoácidos, de aproximadamente de 10 a 20 aminoácidos, o de aproximadamente de 10 a 15 aminoácidos y que incluyen cualquier número entero entre los extremos de cualquiera de los intervalos enumerados. En algunos casos divulgados en el presente documento, una región espaciadora tiene aproximadamente 12 aminoácidos o menos, aproximadamente 119 aminoácidos o menos, o aproximadamente 229 aminoácidos o menos. Los espaciadores de ejemplo incluyen solo la bisagra de IgG4, la bisagra de IgG4 unida a los dominios CH2 y CH3, o la bisagra de IgG4 unida al dominio CH3. Los espaciadores de ejemplo incluyen, pero sin limitación, los descritos en Hudecek *et al.* (2013) Clin. Cancer Res., 19:3153 o en la publicación de solicitud de patente internacional número WO2014031687. En algunos casos divulgados en el presente documento, el espaciador tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 133, y está codificada por la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 134. En algunos casos divulgados en el presente documento, el espaciador tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 135. En algunos casos divulgados en el presente documento, el espaciador tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 136.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la región o porción constante es de IgD. En algunos casos divulgados en el presente documento, el espaciador tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 137. En algunos casos divulgados en el presente documento, el espaciador tiene una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 133, 135, 136 y 137.

El dominio de reconocimiento de antígeno generalmente está unido a uno o más componentes de señalización intracelular, tales como componentes de señalización que imitan la activación a través de un complejo de receptor de antígeno, tal como un complejo TCR, en el caso de un CAR, y/o señal a través de otro receptor de superficie celular. Por lo tanto, en algunos casos divulgados en el presente documento, el componente de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpo) está unido a una o más regiones de señalización transmembrana e intracelular. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio transmembrana se fusiona con el dominio extracelular. En un caso divulgado en el presente documento, se usa un dominio transmembrana que se asocia de manera natural con uno de los dominios en el receptor, por ejemplo, CAR. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio transmembrana se selecciona o se modifica mediante sustitución de aminoácidos para evitar la unión de dichos dominios a los dominios transmembrana de las mismas proteínas de membrana de superficie o diferentes para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio transmembrana procede de una fuente natural o de una fuente sintética. Cuando la fuente es natural, en algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio procede de cualquier proteína unida a la membrana o transmembrana. Las regiones transmembrana incluyen las procedentes de (es decir, comprenden al menos la una o más regiones transmembrana de) la cadena alfa, beta o zeta del receptor de linfocitos T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD 16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD 154. Como alternativa, el dominio transmembrana en algunos casos divulgados en el presente documento es sintético. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio transmembrana sintético comprende predominantemente residuos hidrófobos tales como leucina y valina. En algunos casos divulgados en el presente documento, un triplete de fenilalanina, triptófano y valina se encontrará en cada extremo de un dominio transmembrana sintético. En algunos casos divulgados en el presente documento, el enlace es mediante enlazadores, espaciadores y/o uno o más dominios transmembrana.

Entre las regiones de señalización intracelular se encuentran las que imitan o se aproximan a una señal a través de un receptor de antígeno natural, una señal a través de tal receptor junto con un receptor coestimulador, y/o una señal a través de un receptor coestimulador solo. En algunos casos divulgados en el presente documento, un enlazador olipéptido o polipéptido corto, por ejemplo, un enlazador de entre 2 y 10 aminoácidos de longitud, tal como uno que contiene glicinas y serinas, por ejemplo, doblete de glicina-serina, está presente y forma un enlace entre el dominio transmembrana y el dominio de señalización citoplásmica del CAR.

El receptor, por ejemplo, el CAR, generalmente incluye al menos un componente o componentes de señalización intracelular. En algunos casos divulgados en el presente documento, el receptor incluye un componente intracelular de un complejo TCR, tal como una cadena CD3 de TCR que media en la activación y citotoxicidad de los linfocitos T, por ejemplo, la cadena zeta de CD3. Por lo tanto, en algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio de unión a antígeno del CAR está unido a uno o más módulos de señalización celular. En algunos casos divulgados en el presente documento, los módulos de señalización celular incluyen el dominio transmembrana de CD3, los dominios de señalización intracelular de CD3 y/u otros dominios transmembrana de CD. En algunos casos divulgados en el presente documento, el receptor, por ejemplo, CAR, incluye además una porción de una o más moléculas adicionales tales como el receptor γ de Fc, CD8, CD4, CD25 o CD16. Por ejemplo, en algunos casos divulgados en el presente documento, el CAR incluye una molécula quimérica entre CD3-zeta (CD3- ζ) o el receptor γ de Fc y CD8, CD4, CD25 o CD16.

En algunos casos divulgados en el presente documento, tras la ligadura del CAR, el dominio citoplásmico o la región de señalización intracelular del CAR activa al menos una de las funciones o respuestas efectoras normales de la célula

inmunitaria, por ejemplo, un linfocito T genomanipulado para expresar el CAR. Por ejemplo, en algunos contextos, el CAR induce una función de un linfocito T, tal como la actividad citolítica o la actividad de los linfocitos T auxiliares, tal como la secreción de citocinas u otros factores. En algunos casos divulgados en el presente documento, se usa una porción truncada de una región de señalización intracelular de un componente receptor de antígeno o molécula coestimuladora en lugar de una cadena inmunoestimuladora inalterada, por ejemplo, si transduce la señal de función efectora. En algunos casos divulgados en el presente documento, las regiones de señalización intracelular, por ejemplo, que comprenden un dominio o dominios intracelulares, incluyen las secuencias citoplásmicas del receptor de linfocitos T (TCR) y, en algunos casos divulgados en el presente documento, también las de los correceptores que, en el contexto natural, actúan en sintonía con dicho receptor para iniciar la transducción de señales después de la interacción del receptor del antígeno, y/o cualquier derivado o variante de dichas moléculas, y/o cualquier secuencia sintética que tenga la misma capacidad funcional.

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

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

En algunos casos divulgados en el presente documento, el CAR incluye una secuencia de señalización citoplásmica primaria que regula la activación primaria del complejo TCR. Las secuencias de señalización citoplásmicas primarias que actúan de manera estimuladora pueden contener motivos de señalización que se conocen como motivos de activación del inmunorreceptor basados en tirosina o ITAM. Los ejemplos de ITAM que contienen secuencias de señalización citoplásmicas primarias incluyen las procedentes de TCR o CD3 zeta, FcR gamma o FcR beta. En algunos casos divulgados en el presente documento, la una o más moléculas de señalización citoplásmica en el CAR contienen un dominio de señalización citoplásmica, una porción del mismo, o una secuencia procedente de CD3 zeta.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el CAR incluye una región de señalización y/o una porción transmembrana de un receptor coestimulador, tal como CD28, 4-1BB, OX40, DAP10 e ICOS. En algunos casos divulgados en el presente documento, el mismo CAR incluye tanto la región de señalización como los componentes coestimuladores.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la región de señalización está incluida dentro de un CAR, mientras que el componente coestimulador lo proporciona otro CAR que reconoce otro antígeno. En algunos casos divulgados en el presente documento, los CAR incluyen CAR activadores o estimuladores y CAR coestimuladores, ambos expresados en la misma célula (véase el documento WO2014/055668).

En determinados casos divulgados en el presente documento, la región de señalización intracelular comprende un dominio transmembrana de CD28 y un dominio de señalización unido a un dominio intracelular de CD3 (por ejemplo, CD3-zeta). En algunos casos divulgados en el presente documento, la región de señalización intracelular comprende dominios coestimuladores CD28 y CD137 (4-1BB, TNFRSF9) quiméricos, unidos a un dominio intracelular CD3 zeta.

En algunos casos divulgados en el presente documento, 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 porción citoplásmica. Los CAR de ejemplo incluyen componentes intracelulares de CD3-zeta, CD28 y 4-1BB.

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

En algunos casos divulgados en el presente documento, el receptor de antígeno quimérico incluye una porción extracelular que contiene el anticuerpo o fragmento descrito en el presente documento. En algunos casos divulgados en el presente documento, el receptor de antígeno quimérico incluye una porción extracelular que contiene el anticuerpo o fragmento descrito en el presente documento y un dominio de señalización intracelular. En algunos casos

divulgados en el presente documento, el anticuerpo o fragmento incluye un scFv o un anticuerpo de un solo dominio V_H y el dominio intracelular contiene un ITAM. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio de señalización intracelular incluye un dominio de señalización de una cadena zeta de una cadena CD3-zeta (CD3ζ). En algunos casos divulgados en el presente documento, el receptor de antígeno quimérico incluye un dominio transmembrana dispuesto entre el dominio extracelular y la región de señalización intracelular.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio transmembrana contiene una porción transmembrana de CD28. El dominio extracelular y el transmembrana se pueden unir directa o indirectamente. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio extracelular y el transmembrana están unidos por un espaciador, tal como cualquiera descrito en el presente documento. En algunos casos divulgados en el presente documento, el receptor quimérico para el antígeno contiene un dominio intracelular de una molécula coestimuladora de linfocitos T, tal como entre el dominio transmembrana y el dominio de señalización intracelular. En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula coestimuladora de linfocitos T es CD28 o 4-1BB.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el CAR contiene un anticuerpo, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo, un dominio transmembrana que es o contiene una porción transmembrana de CD28 o una variante funcional del mismo, y un dominio de señalización intracelular que contiene una porción de señalización de CD28 o una variante funcional del mismo y una porción de señalización de CD3 zeta o una variante funcional del mismo. En algunos casos divulgados en el presente documento, el CAR contiene un anticuerpo, por ejemplo, fragmento de anticuerpo, un dominio transmembrana que es o contiene una porción transmembrana de CD28 o una variante funcional del mismo, y un dominio de señalización intracelular que contiene una porción de señalización de 4-1BB o una variante funcional del mismo y una porción de señalización de CD3 zeta o una variante funcional del mismo. En algunos de estos casos divulgados en el presente documento, el receptor incluye además un espaciador que contiene una porción de una molécula de Ig, tal como una molécula de Ig humana, tal como una bisagra de Ig, por ejemplo, una bisagra de IgG4, tal como un espaciador de bisagra solo.

En algunos casos divulgados en el presente documento, 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 (número de registro: P10747.1), o es un dominio transmembrana que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 138 o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 138; en algunos casos divulgados en el presente documento, la porción que contiene el dominio transmembrana del receptor recombinante comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 139 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos o aproximadamente un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con la misma.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el receptor quimérico para el antígeno contiene un dominio intracelular de una molécula coestimuladora de linfocitos T. En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula coestimuladora de linfocitos T es CD28 o 4-1BB.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la región de señalización intracelular comprende un dominio de señalización coestimulador intracelular de CD28 humano o una variante funcional o porción del mismo, tal como un dominio de 41 aminoácidos del mismo y/o tal dominio con una sustitución de LL a GG en las posiciones 186-187 de una proteína CD28 natural. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio de señalización intracelular puede comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 140 o 141 o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 140 o 141. En algunos casos divulgados en el presente documento, la región intracelular comprende un dominio de señalización coestimulador intracelular de 4-1BB o una variante funcional o porción del mismo, tal como un dominio citoplasmático de 42 aminoácidos de un 4-1BB humano (n.º de registro Q07011.1) o una variante funcional o una porción del mismo, tal como la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 142 o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 142.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la región de señalización intracelular comprende una cadena de CD3 humano, 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 un dominio de señalización de 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 divulgados en el presente documento, la región de señalización intracelular comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 143, 144 o 145 o una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 143, 144 o 145.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el espaciador contiene solo una región bisagra de una IgG, tal como solo una bisagra de IgG4 o IgG1, tal como solo el espaciador de bisagra expuesto en la SEQ ID NO: 133. En

otros casos divulgados en el presente documento, el espaciador es una bisagra de Ig, por ejemplo, y una bisagra de IgG4, unida a los dominios C_H2 y/o C_H3. En algunos casos divulgados en el presente documento, el espaciador es una bisagra de Ig, por ejemplo, una bisagra de IgG4, unida a los dominios C_H2 y C_H3, tal como se expone en la SEQ ID NO:135. En algunos casos divulgados en el presente documento, el espaciador es una bisagra de Ig, por ejemplo, una bisagra de IgG4, unida únicamente a un dominio C_H3, tal como se expone en la SEQ ID NO:136. En algunos casos divulgados en el presente documento, el espaciador es o comprende una secuencia rica en glicina-serina u otro enlazador flexible tal como los enlazadores flexibles conocidos.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el receptor recombinante, por ejemplo, el CAR u otro receptor de antígeno incluye además un marcador, tal como un marcador de superficie celular, que puede usarse para confirmar la transducción o el diseño genético de la célula para expresar el receptor, tal como una versión truncada de un receptor de superficie celular, tal como EGFR truncado (tEGFR). En algunos casos divulgados en el presente documento, el marcador incluye todo o parte (por ejemplo, forma truncada) de CD34, un NGFR o receptor del factor de crecimiento epidérmico (por ejemplo, tEGFR). En determinados casos divulgados en el presente documento, el tEGFR contiene una secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 147 o 148. En casos particulares divulgados en el presente documento, el tEGFR contiene una secuencia de aminoácidos con o con aproximadamente o al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o un 99 % de identidad con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 147 o 148. En algunos casos divulgados en el presente documento, el ácido nucleico que codifica el marcador está unido operativamente a un polinucleótido que codifica una secuencia enlazadora, tal como una secuencia enlazadora escindible, por ejemplo, T2A. Por ejemplo, un marcador, y opcionalmente, una secuencia enlazadora, puede ser cualquiera de los divulgados en la solicitud de patente publicada N.º WO2014031687. Por ejemplo, el marcador puede ser un EGFR truncado (tEGFR), es decir, opcionalmente, unido a una secuencia enlazadora, tal como una secuencia enlazadora escindible de T2A.

En determinados casos donde las moléculas de ácido nucleico codifican dos o más cadenas polipeptídicas diferentes, cada una de las cadenas polipeptídicas puede estar codificada por una molécula de ácido nucleico distinta. Por ejemplo, se proporcionan dos ácidos nucleicos distintos, y cada uno de ellos puede transferirse o introducirse individualmente en la célula para su expresión en la misma.

En algunos casos divulgados en el presente documento, tales como aquellos en los que el polinucleótido contiene una primera y segunda secuencia de ácido nucleico, las secuencias codificantes que codifican cada una de las diferentes cadenas polipeptídicas pueden estar unidas operativamente a un promotor, que puede ser el mismo o diferente. En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de ácido nucleico puede contener un promotor que dirija la expresión de dos o más cadenas polipeptídicas diferentes. En algunos casos divulgados en el presente documento, dichas moléculas de ácido nucleico pueden ser multicistrónicas (bicistrónicas o tricistrónicas, véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. N.º 6.060.273). En algunos casos divulgados en el presente documento, las unidades de transcripción se pueden genomanipular como una unidad bicistrónica que contenga un IRES (sitio interno de entrada al ribosoma), lo que permite la coexpresión de productos génicos (por ejemplo, que codifican el PSMA o una forma modificada del mismo y que codifican el receptor recombinante) mediante un mensaje de un único promotor. Como alternativa, en algunos casos, un único promotor puede dirigir la expresión de un ARN que contenga, en un solo marco abierto de lectura (ORF), dos o tres genes (por ejemplo, que codifican el PSMA o una forma modificada del mismo y que codifican el receptor recombinante) separados entre sí por secuencias que codifican un péptido autoescindible (por ejemplo, secuencias 2A) o un sitio de reconocimiento de proteasa (por ejemplo, furina). Por lo tanto, el ORF codifica un único polipéptido, que, ya sea durante (en el caso de 2A) o después de la traducción, se procesa en proteínas individuales. En algunos casos, el péptido, tal como un T2A, puede hacer que el ribosoma se salte (salto ribosómico) la síntesis de un enlace peptídico en el extremo C de un elemento 2A, lo que conduce a la separación entre el extremo de la secuencia 2A y el siguiente péptido posterior (véase, por ejemplo, de Felipe. *Genetic Vaccines and Ther.* 2:13 (2004) y de Felipe *et al.* *Traffic* 5:616-626 (2004)). Se conocen diversos elementos 2A. Son ejemplos de secuencias 2A que se pueden usar en los métodos y el sistema divulgado en el presente documento, sin limitación, las secuencias 2A del virus de la fiebre aftosa (F2A, por ejemplo, SEQ ID NO: 32), virus de la rinitis equina A (E2A, por ejemplo, SEQ ID NO: 153), virus Thossea asigna (T2A, por ejemplo, SEQ ID NO: 146 o 149) y teschovirus porcino-1 (P2A, por ejemplo, SEQ ID NO: 151 o 152) como se describe en la publicación de patente de EE. UU. N.º 20070116690.

2. Receptores de linfocitos T (TCR)

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

En algunos casos divulgados en el presente documento, un "receptor de linfocitos 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 α y TCR β , respectivamente), o porciones de unión a antígeno de las mismas, y que es capaz de unirse específicamente a un péptido unido a una molécula del MHC. En algunos casos divulgados en el presente documento, el TCR está en la forma $\alpha\beta$. Típicamente, los TCR que existen en las formas $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ son, por lo

general, estructuralmente similares, pero los linfocitos T que los expresan pueden tener distintas ubicaciones o funciones anatómicas. Un TCR se puede encontrar en la superficie de una célula o en forma soluble. Generalmente, un TCR se encuentra en la superficie de células T (o linfocitos T) donde generalmente es responsable de reconocer los antígenos unidos a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC).

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

En algunos casos divulgados en el presente documento, los dominios variables del TCR contienen bucles hipervariables, o regiones determinantes de complementariedad (CDR), que, generalmente, son los principales contribuyentes al reconocimiento del antígeno y a las capacidades de unión y especificidad. En algunos casos divulgados en el presente documento, 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 del TCR generalmente están separadas por regiones marco (FR), que generalmente presentan menos variabilidad entre las moléculas de TCR en comparación con las CDR (véase, por ejemplo, Jores *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 87:9138, 1990; Chothia *et al.*, EMBO J. 7:3745, 1988; véase también Lefranc *et al.*, Dev. Comp. Immunol. 27:55, 2003). En algunos casos divulgados en el presente documento, la CDR3 es la principal CDR responsable de la unión al antígeno o de la especificidad por el antígeno, o es la más importante entre las tres CDR de una determinada región variable del TCR para el reconocimiento del antígeno, y/o para la interacción con la porción peptídica procesada del complejo péptido-MHC. En algunos contextos, la CDR1 de la cadena alfa puede interactuar con la parte del extremo N de determinados péptidos antigénicos. En algunos contextos, la CDR1 de la cadena beta interactúa con la parte en el extremo C del péptido. En algunos contextos, la CDR2 contribuye en mayor medida o es la principal CDR responsable de la interacción o el reconocimiento de la porción MHC del complejo MHC-péptido. En algunos casos divulgados en el presente documento, la región variable de la cadena β puede contener una región hipervariable (CDR4 o HVR4) adicional, que generalmente interviene en la unión del superantígeno y no en el reconocimiento del antígeno (Kotb (1995) Clinical Microbiology Reviews, 8:411-426).

En algunos casos divulgados en el presente documento, 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, 3.^a Ed., Current Biology Publications, pág. 4:33, 1997). En algunos casos divulgados en el presente documento, cada cadena del TCR puede poseer un dominio variable de inmunoglobulina en el extremo N, un dominio constante de inmunoglobulina, una región transmembrana y una cola citoplasmática corta en el extremo C. En algunos casos divulgados en el presente documento, un TCR se asocia a proteínas invariantes del complejo CD3 implicadas en la mediación de la transducción de señales.

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

En algunos casos divulgados en el presente documento, las cadenas de TCR contienen un dominio transmembrana. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio transmembrana está cargado positivamente. En algunos casos, las cadenas de TCR contienen una cola citoplasmática. En algunos casos, la estructura permite que el TCR se asocie a otras moléculas como CD3 y subunidades de la misma. Por ejemplo, un TCR que contiene dominios constantes con una región transmembrana puede anclar la proteína en la membrana celular y asociarse a subunidades invariantes del aparato o complejo de señalización de CD3. Las colas intracelulares de las subunidades de

señalización de CD3 (por ejemplo, cadenas CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ y CD3 ζ) contienen uno o más motivos de activación del inmunorreceptor a base de tirosina o ITAM que intervienen en la capacidad de señalización del complejo TCR.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el TCR puede ser un heterodímero de dos cadenas α y β (u opcionalmente γ y δ) o puede ser una construcción de TCR monocatenaria. En algunos casos divulgados en el presente documento, el TCR es un heterodímero que contiene dos cadenas distintas (cadenas α y β o cadenas γ y δ) que están unidas, tal como por un enlace disulfuro o enlaces disulfuro.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el TCR puede generarse a partir de una o más secuencias de TCR conocidas, tal como secuencias de cadenas V α , β , para las que se dispone de una secuencia codificante de longitud sustancialmente completa. Se conocen bien métodos para obtener secuencias de TCR de longitud completa, incluyendo las secuencias de cadena V, de fuentes celulares. En algunos casos divulgados en el presente documento, los ácidos nucleicos que codifican el TCR pueden obtenerse de diversas fuentes, tal como mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los ácidos nucleicos que codifican el TCR dentro de una célula o células determinadas o aislados de ellas, o la síntesis de secuencias de ADN del TCR disponibles públicamente.

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

En algunos casos divulgados en el presente documento, el TCR se genera a partir de un TCR identificado o seleccionado a partir de la exploración de una biblioteca de TCR candidatos contra un antígeno polipéptido diana, o un epitopo de linfocitos T diana del mismo. Las bibliotecas de TCR pueden generarse mediante la amplificación del repertorio de V α y V β de linfocitos T aislados de un sujeto, incluyendo las células presentes en las PBMC, bazo u otro órgano linfóide. En algunos casos, los linfocitos T pueden amplificarse a partir de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL). En algunos casos divulgados en el presente documento, las bibliotecas de TCR pueden generarse a partir de células CD4 $^{+}$ o CD8 $^{+}$. En algunos casos divulgados en el presente documento, los TCR se pueden amplificar a partir de una fuente de linfocitos T de un sujeto normal o sano, es decir, bibliotecas de TCR normales. En algunos casos divulgados en el presente documento, los TCR se pueden amplificar a partir de una fuente de linfocitos T de un sujeto enfermo, es decir, bibliotecas de TCR enfermas. En algunos casos divulgados en el presente documento, se usan cebadores degenerados para amplificar el repertorio de genes de V α y V β , tal como mediante RT-PCR en muestras, tales como linfocitos T, obtenidas de seres humanos. En algunos casos divulgados en el presente documento, las bibliotecas scTv se pueden ensamblar a partir de bibliotecas V α y V β indiferenciadas en las que los productos amplificados se clonan o ensamblan para ser separados por un enlazador. Dependiendo de la fuente del sujeto y de las células, las bibliotecas pueden ser específicas para el alelo del HLA. Como alternativa, en algunos casos divulgados en el presente documento, pueden generarse bibliotecas de TCR mediante mutagénesis o diversificación de una molécula de TCR precursora o estructural. En algunos casos divulgados en el presente documento, los TCR se someten a evolución dirigida, tal como mediante mutagénesis, por ejemplo, de la cadena α o β . En algunos casos divulgados en el presente documento, se alteran residuos particulares dentro de las CDR del TCR. En algunos casos divulgados en el presente documento, los TCR seleccionados se pueden modificar mediante maduración por afinidad. En algunos casos divulgados en el presente documento, pueden seleccionarse linfocitos T específicos de antígeno, tal como mediante exploración para evaluar la actividad de los CTL contra el péptido. En algunos casos divulgados en el presente documento, los TCR, por ejemplo, presentes en los linfocitos T específicos de antígeno, pueden seleccionarse, tal como mediante actividad de unión, por ejemplo, afinidad o avidéz particular por el antígeno.

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

En algunos casos divulgados en el presente documento, se conocen o pueden identificarse fácilmente por un experto en la técnica péptidos de un polipéptido diana para su uso en la producción o generación de un TCR de interés. En

algunos casos divulgados en el presente documento, los péptidos adecuados para su uso en la generación de los TCR o porciones de unión a antígeno pueden determinarse basándose en la presencia de un motivo restringido al HLA en un polipéptido diana de interés, tal como un polipéptido diana descrito más adelante. En algunos casos divulgados en el presente documento, los péptidos se identifican usando los modelos informáticos de predicción disponibles. En algunos casos divulgados en el presente documento, para predecir los sitios de unión del MHC de clase I, dichos modelos incluyen, pero sin limitación, 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 divulgados en el presente documento, el epítipo restringido al MHC es HLA-A0201, que se expresa en aproximadamente un 39-46 % de todos los caucásicos y, por lo tanto, representa una elección adecuada de antígeno del MHC para su uso en la preparación de un TCR u otra molécula de unión al péptido MHC.

Los expertos en la técnica conocen los motivos de unión de HLA-A0201 y los sitios de escisión para proteosomas e inmunoproteosomas usan modelos informáticos de predicción. Para predecir los sitios de unión del MHC de clase I, dichos modelos incluyen, pero sin limitación, ProPred1 (descrito con más detalle en Singh y Raghava, ProPred: predicción de sitios de unión HLA-DR. *BIOINFORMATICS* 17(12):1236-1237 2001), y SYFPEITHI (véase Schuler *et al.* SYFPEITHI, Database for Searching and T-Cell Epitope Prediction. en *Immunoinformatics Methods in Molecular Biology*, vol. 409(1): 75-93 2007)

En algunos casos divulgados en el presente documento, el TCR o la porción de unión a antígeno del mismo puede ser una proteína natural producida de manera recombinante o una forma mutada de la misma en la que una o más propiedades, tal como una característica de unión, se han alterado. En algunos casos divulgados en el presente documento, un TCR puede proceder de una de varias especies animales, tal como un ser humano, ratón, rata u otro mamífero. Un TCR puede estar unido a células o en forma soluble. En algunos casos divulgados en el presente documento, para los propósitos de los métodos divulgados, el TCR está unido a una célula y se expresa en la superficie de la misma.

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

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

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

En algunos casos divulgados en el presente documento, un dTCR contiene una cadena α de TCR con que contiene un dominio α variable, un dominio α constante y un primer motivo de dimerización unido al extremo C del dominio α constante, y una cadena β de TCR que comprende un dominio β variable, un dominio β constante y un primer motivo de dimerización unido al extremo C del dominio β constante, en donde el primer y el segundo motivos de dimerización interaccionan fácilmente para formar un enlace covalente entre un aminoácido del primer motivo de dimerización y un aminoácido del segundo motivo de dimerización que une la cadena α de TCR y la cadena β de TCR.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el TCR es un scTCR. Típicamente, un scTCR se puede generar usando métodos conocidos por los expertos en la técnica, Véanse, por ejemplo, Soo Hoo, W. F. *et al.* PNAS (USA) 89, 4759 (1992); Wiilfing, C. y Plückthun, A., J. Mol. Biol. 242, 655 (1994); Kurucz, I. *et al.* PNAS (USA) 90 3830 (1993); las PCT internacionales publicadas n.º WO 96/13593, WO 96/18105, WO99/60120, WO99/18129, WO 03/020763, WO2011/044186; y Schlueter, C. J. *et al.* J. Mol. Biol. 256, 859 (1996). En algunos casos divulgados en el

presente documento, un scTCR contiene un enlace disulfuro intercatenario no natural introducido para facilitar la asociación de las cadenas del TCR (véase, por ejemplo, la publicación internacional PCT n.º WO 03/020763). En algunos casos divulgados en el presente documento, un scTCR es un TCR truncado no unido por disulfuro en el que cremalleras de leucina heterólogas fusionadas a los extremos C de las mismas facilitan la asociación de cadenas (véase, por ejemplo, la publicación internacional PCT n.º WO99/60120). En algunos casos divulgados en el presente documento, un scTCR contiene un dominio variable TCR α unido covalentemente a un dominio variable TCR β mediante un enlazador peptídico (véase, por ejemplo, la publicación internacional PCT n.º WO99/18129).

En algunos casos divulgados en el presente documento, un scTCR comprende un primer segmento constituido por una secuencia de aminoácidos correspondiente a una región variable de la cadena α de TCR, un segundo segmento constituido por una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia de región variable de cadena β de TCR fusionada al extremo N de una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena β de TCR, y una secuencia enlazadora que une el extremo C del primer segmento al extremo N del segundo segmento.

En algunos casos divulgados en el presente documento, un scTCR contiene un primer segmento constituido por una secuencia de región variable de cadena α fusionada al extremo N de una secuencia de dominio constante extracelular de cadena α , y un segundo segmento constituido por una secuencia de región variable de cadena β fusionada al extremo N de una secuencia constante extracelular de cadena β y una secuencia transmembrana, y, opcionalmente, una secuencia enlazadora que une el extremo C del primer segmento con el extremo N del segundo segmento.

En algunos casos divulgados en el presente documento, un scTCR contiene un primer segmento constituido por una secuencia de región variable de cadena β del TCR fusionada al extremo N de una secuencia de dominio constante extracelular de cadena β , y un segundo segmento constituido por una secuencia de región variable de cadena α fusionada al extremo N de una secuencia constante extracelular de cadena α y una secuencia transmembrana, y, opcionalmente, una secuencia enlazadora que une el extremo C del primer segmento con el extremo N del segundo segmento.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el enlazador de un scTCR que une el primer y segundo segmentos del TCR puede ser cualquier enlazador capaz de formar una única cadena polipeptídica, conservando al mismo tiempo la especificidad de unión al TCR. En algunos casos divulgados en el presente documento, la secuencia enlazadora puede, por ejemplo, tener la fórmula -P-AA-P- en donde P es prolina y AA representa una secuencia de aminoácidos en donde los aminoácidos son glicina y serina. En algunos casos divulgados en el presente documento, el primer y segundo segmentos están emparejados de tal manera que las secuencias de región variable de la misma están orientadas para dicha unión. Por lo tanto, en algunos casos, el enlazador tiene una longitud que es suficiente para abarcar la distancia entre el extremo C del primer segmento y el extremo N del segundo segmento, o viceversa, pero que no es tan larga como para bloquear o reducir la unión del scTCR al ligando diana. En algunos casos divulgados en el presente documento, el enlazador puede contener de, o de aproximadamente, 10 a 45 aminoácidos, tal 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 divulgados en el presente documento, el enlazador tiene la fórmula -PGGG-(SGGGG)5-P-, en donde P es prolina, G es glicina y S es serina (SEQ ID NO:28). En algunos casos divulgados en el presente documento, el enlazador tiene la secuencia GSADDAKKDAKKDGGK (SEQ ID NO:29).

En algunos casos divulgados en el presente documento, el scTCR contiene un enlace disulfuro covalente que une un residuo de la región de inmunoglobulina del dominio constante de la cadena α a un residuo de la región de inmunoglobulina del dominio constante de la cadena β . En algunos casos divulgados en el presente documento, en un TCR natural no hay enlaces disulfuro intercatenarios. Por ejemplo, en algunos casos divulgados en el presente documento, una o más cisteínas se pueden incorporar a las secuencias extracelulares de la región constante del primer y segundo segmentos del polipéptido scTCR. En algunos casos, puede ser deseable tanto un enlace disulfuro natural como uno no natural.

En algunos casos divulgados en el presente documento de un dTCR o scTCR que contiene enlaces disulfuro intercatenarios introducidos, no hay enlaces disulfuro naturales. En algunos casos divulgados en el presente documento, la una o más de las cisteínas naturales que forman un enlace disulfuro intercatenario natural se sustituyen por otro residuo, tal como a una serina o alanina. En algunos casos divulgados en el presente documento, mutando residuos que no son cisteína en el primer y segundo segmentos por cisteína, puede formarse un enlace disulfuro introducido. Los enlaces disulfuro no naturales de ejemplo de un TCR se describen en la solicitud PCT internacional publicada n.º WO2006/000830.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el TCR o fragmento de unión a antígeno del mismo presenta una afinidad con una constante de unión en equilibrio por un antígeno diana de entre o entre aproximadamente 10⁻⁵ y 10⁻¹² M y todos los valores individuales e intervalos incluidos. En algunos casos divulgados en el presente documento, el antígeno diana es un complejo MHC-péptido o un ligando.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el ácido nucleico o 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 se puede usar para transformar o transfectar cualquier hospedador adecuado. Como vectores adecuados se incluyen los que están diseñados para la propagación y ampliación o para la expresión o ambas cosas, tales como plásmidos y virus.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el vector puede ser un vector de la serie pUC (Fermentas Life Sciences), la serie pBluescript (Stratagene, LaJolla, Calif.), la serie pET (Novagen, Madison, Wis.), la serie pGEX (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) o la serie pEX (Clontech, Palo Alto, Calif.). En algunos casos, también se pueden usar vectores bacteriófagos, tales como λ G10, λ GT11, λ ZapII (Stratagene), λ EMBL4 y λ NM1149. En algunos casos divulgados en el presente documento, se pueden usar vectores de expresión de plantas e incluyen pBI01, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 y pBIN19 (Clontech). En algunos casos divulgados en el presente documento, los vectores de expresión de animales incluyen pEUK-CI, pMAM y pMAMneo (Clontech). En algunos casos divulgados en el presente documento, se usa un vector vírico, tal como un vector retrovírico.

En algunos casos divulgados en el presente documento, los vectores de expresión recombinante pueden prepararse usando técnicas estándar de ADN recombinante. En algunos casos divulgados en el presente documento, los vectores pueden contener secuencias reguladoras, tales como codones iniciadores y finalizadores de la transcripción y la traducción, que son específicos del tipo de hospedador (por ejemplo, bacteria, hongo, planta o animal) en el que se va a introducir el vector, según corresponda y teniendo en cuenta si el vector está basado en ADN o ARN. En algunos casos divulgados en el presente documento, el vector puede contener un promotor no natural unido operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica el TCR o la porción de unión a antígeno (u otra molécula de unión al péptido MHC). En algunos casos divulgados en el presente documento, el promotor puede ser un promotor no vírico o un promotor vírico, tal como un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor de SV40, un promotor del VRS, y un promotor que se encuentra en las repeticiones terminales largas del virus de las células madre murinas. También se contemplan otros promotores conocidos.

En algunos casos divulgados en el presente documento, para generar un vector que codifique un TCR, las cadenas α y β se amplifican por PCR a partir de ADNc total aislado de un clon de linfocitos T que expresa el TCR de interés y se clonan en un vector de expresión. En algunos casos divulgados en el presente documento, las cadenas α y β se clonan en el mismo vector. En algunos casos divulgados en el presente documento, las cadenas α y β se clonan en vectores diferentes. En algunos casos divulgados en el presente documento, las cadenas α y β generadas se incorporan en un vector retrovírico, por ejemplo, lentivírico.

C. Introducción de ácidos nucleicos y vectores en células

Diversos métodos para la introducción de componentes genomanipulados, por ejemplo, receptores recombinantes, por ejemplo, CAR o TCR, se conocen bien y pueden usarse con los métodos y composiciones divulgados. Como métodos de ejemplo se incluyen los de la transferencia de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos o receptores, incluyendo a través de vectores víricos, por ejemplo, vectores retrovíricos o lentivíricos, no víricos o transposones, por ejemplo, el sistema de transposón *Bella Durmiente*. Los métodos de transferencia de genes pueden incluir transducción, electroporación u otro método que dé como resultado una transferencia de genes a la célula.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la transferencia de genes se logra estimulando primero la célula, tal como combinándola con un estímulo que induzca una respuesta tal como proliferación, supervivencia y/o activación, por ejemplo, según lo medido mediante la expresión de una citocina o marcador de activación, seguida de la transducción de las células activadas y la expansión en cultivo a cantidades suficientes para aplicaciones clínicas.

En algunos contextos, puede ser deseable protegerse contra la posibilidad de que la sobreexpresión de un factor estimulador (por ejemplo, una linfocina o una citocina) pueda potencialmente dar como resultado un resultado no deseado o una menor eficacia en un sujeto, tal como un factor asociado con la toxicidad en un sujeto. Por lo tanto, en algunos contextos, las células genomanipuladas incluyen segmentos génicos que hacen que las células sean susceptibles a la selección negativa *in vivo*, tal como tras la administración en inmunoterapia adoptiva. Por ejemplo, en algunos casos divulgados en el presente documento, las células están genomanipuladas de modo que puedan eliminarse como resultado de un cambio en la condición *in vivo* del paciente al que se administran. El fenotipo seleccionable negativo puede ser resultado de la inserción de un gen que confiere sensibilidad a un agente administrado, por ejemplo, un compuesto. Los genes seleccionables negativos incluyen el gen de la timidina cinasa del virus del herpes simple de tipo I (HSV-I TK) (Wigler *et al.*, Cell 2:223, 1977) que confiere sensibilidad al ganciclovir; el gen de la hipoxantina fosforibosiltransferasa celular (HPRF), el gen de la adenina fosforibosiltransferasa celular (APRT), citosina desaminasa bacteriana, (Mullen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:33 (1992)).

En algunos casos divulgados en el presente documento, las células, por ejemplo, linfocitos T, pueden transfectarse durante o después de la expansión, por ejemplo, con ácidos nucleicos que codifican un receptor recombinante, por ejemplo, un receptor de linfocitos T (TCR) o un receptor de antígeno quimérico (CAR). Esta transfección para la introducción del gen del polipéptido o receptor deseado puede realizarse con cualquier sistema de transferencia basada en genes adecuado, incluso mediante un vector retrovírico. En algunos casos divulgados en el presente documento, la población de células genomanipuladas puede, concurrente, simultánea o posteriormente, ser

estimulada con un estímulo antigénico, por ejemplo, mediante el receptor introducido *de novo*, tal como de acuerdo con los métodos divulgados. En algunos casos divulgados en el presente documento, la molécula de unión presente en las partículas divulgadas, por ejemplo, perlas, proporciona un estímulo antigénico, tal como el proporcionado en forma de un antígeno afin (de reticulación) o ligando del receptor introducido genéticamente (por ejemplo, ligando natural de un CAR) o un anticuerpo antiidiotipo que se une directamente o reconoce el receptor recombinante.

Entre los ácidos nucleicos adicionales, por ejemplo, los genes para la introducción son aquellos que mejoran la eficacia de la terapia, tal como promoviendo la viabilidad y/o la 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 se describe por Lupton S. D. *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 describen el uso de genes de fusión seleccionables bifuncionales obtenidos de la fusión de un marcador seleccionable positivo dominante con un marcador seleccionable negativo. Véase, por ejemplo, Riddell *et al.*, patente de EE. UU. N.º 6.040.177, en las columnas 14-17.

Como se ha descrito anteriormente, en algunos casos divulgados en el presente documento, las células se incuban y/o se cultivan antes de o en relación con la ingeniería genética. Las etapas de incubación pueden incluir cultivar, cultivo, estimulación, activación, propagación y/o congelación para su conservación, por ejemplo, la crioconservación.

1. Partículas de vector vírico

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

En algunos casos divulgados en el presente documento, el vector retrovírico tiene una secuencia de repetición terminal larga (LTR), por ejemplo, un vector retrovírico procedente 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 murinas (MSCV), virus formador de focos del bazo (SFFV) o virus adenoasociado (AAV). La mayoría de los vectores retrovíricos se obtienen de retrovirus murinos. En algunos casos divulgados en el presente documento, los retrovirus incluyen los obtenidos de cualquier fuente de células de aves o mamíferos. Los retrovirus típicamente son anfitrópicos, lo que significa que son capaces de infectar células hospedadoras de varias especies, incluyendo seres humanos. En un caso divulgado en el presente documento, el gen que se va a expresar sustituye el hueco retrovírico, las secuencias pol y/o env. Se han descrito varios sistemas retrovíricos ilustrativos (por ejemplo, Pat. de EE. UU. N.º 5.219.740; 6.207.453; 5.219.740; Miller y Rosman (1989) BioTechniques 7:980-990; Miller, A. D. (1990) Human Gene Therapy 1:5-14; Scarpa *et al.* (1991) Virology 180:849-852; Burns *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8033-8037; y Boris-Lawrie y Temin (1993) Cur. Opin. Genet. Develop. 3:102-109.

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

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

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

Los ejemplos no limitantes de vectores lentivíricos incluyen los procedentes de un lentivirus, tal como el virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1), HIV-2, un virus de inmunodeficiencia del simio (VIS), virus linfotrópico T humano

1 (HTLV-1), HTLV-2 o virus de la anemia infecciosa equina (E1AV). Por ejemplo, se han generado vectores lentivíricos atenuando de forma múltiple los genes de virulencia del VIH, por ejemplo, los genes *env*, *vif*, *vpr*, *vpu* y *nef* se eliminan, haciendo que el vector sea más seguro para fines terapéuticos. Se conocen en la técnica vectores lentivíricos, véanse Naldini *et al.*, (1996 y 1998); Zufferey *et al.*, (1997); Dull *et al.*, 1998, Pat. de EE. UU. N.º 6.013.516; y 5.994.136). En algunos casos divulgados en el presente documento, estos vectores víricos están basados en plásmidos o en virus, y están configurados para transportar las secuencias esenciales para incorporar ácido nucleico exógeno, para la selección y para la transferencia del ácido nucleico a una célula hospedadora. Los lentivirus conocidos se pueden obtener fácilmente de depósitos o colecciones tales como la Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC"); 10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209), o aislarse de fuentes conocidas mediante técnicas comúnmente disponibles.

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

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

Opcionalmente, la secuencia U3 de la LTR 5' lentivírica se puede reemplazar por una secuencia promotora en la construcción vírica, tal como una secuencia promotora heteróloga. Esto puede aumentar el valor del virus recuperado de la estirpe celular de empaquetamiento. También se puede incluir una secuencia potenciadora. Se puede usar cualquier combinación de potenciador/promotor que aumente la expresión del genoma de ARN vírico en la estirpe celular de empaquetamiento. En un caso divulgado en el presente documento, se usa la secuencia potenciadora/promotora del CMV (Pat. de EE. UU. N.º 5.385.839 y Pat. de EE. UU. N.º 5.168.062).

En determinados casos divulgados en el presente documento, el riesgo de mutagénesis insercional puede minimizarse construyendo el genoma del vector retrovírico, tal como el genoma del vector lentivírico, para que sea una integración defectuosa. Se puede seguir una diversidad de enfoques para producir un genoma del vector no integrante. En algunos casos divulgados en el presente documento, una o más mutaciones se pueden genomanipular en el componente de la enzima integrasa del gen *pol*, de tal manera que codifique una proteína con una integrasa inactiva. En algunos casos divulgados en el presente documento, el propio genoma del vector se puede modificar para evitar la integración, por ejemplo, mediante la mutación o delección de uno o ambos sitios de unión, o haciendo que la LTR 3'-tracto de polipurina proximal (PPT) no sea funcional mediante delección o modificación. En algunos casos divulgados en el presente documento, hay disponibles enfoques no genéticos; estos incluyen agentes farmacológicos que inhiben una o más funciones de la integrasa. Los enfoques no son excluyentes entre sí; es decir, se puede usar más de uno a la vez. Por ejemplo, tanto la integrasa como los sitios de unión pueden no ser funcionales, o la integrasa y el sitio PPT pueden no ser funcionales, o los sitios de unión y el sitio de PPT pueden no ser funcionales, o todos ellos pueden no ser funcionales. Tales métodos y genomas de vectores víricos son conocidos y están disponibles (véase Philpott y Thrasher, Human Gene Therapy 18:483, 2007; Engelman *et al.* J Virol 69:2729, 1995; Brown *et al.* J Virol 73:9011 (1999); documento WO 2009/076524; McWilliams *et al.*, J Virol 77:11150, 2003; Powell y Levin J Virol 70:5288, 1996).

En algunos casos divulgados en el presente documento, el vector contiene secuencias para su propagación en una célula hospedadora, tal como una célula hospedadora procariota. En algunos casos divulgados en el presente documento, el ácido nucleico del vector vírico contiene uno o más orígenes de replicación para la propagación en una célula procariota, tal como una célula bacteriana. En algunos casos divulgados en el presente documento, los vectores que incluyen un origen de replicación procariota también pueden contener un gen cuya expresión confiere un marcador detectable o seleccionable tal como una resistencia a fármacos.

El genoma del vector vírico se construye típicamente en forma de plásmido que se puede transfectar en una estirpe

celular de empaquetamiento o productora. Se puede usar cualquiera de una diversidad de métodos conocidos para producir partículas retrovíricas cuyo genoma contenga una copia de ARN del genoma del vector vírico. En algunos casos divulgados en el presente documento, al menos dos componentes intervienen en la fabricación de un sistema de suministro de genes basado en virus: en primer lugar, plásmidos de empaquetamiento, que abarcan las proteínas estructurales, así como las enzimas necesarias para generar una partícula de vector vírico, y segundo, el propio vector vírico, es decir, el material genético que se va a transferir. En el diseño de uno de estos componentes o de ambos pueden introducirse medidas de bioseguridad.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el plásmido de empaquetamiento puede contener todas las proteínas retrovíricas, tal como HIV-1, distintas de las proteínas de la envoltura (Naldini *et al.*, 1998). En otros casos divulgados en el presente documento, los vectores víricos pueden carecer de genes víricos adicionales, tales como los que están asociados a la virulencia, por ejemplo, vpr, vif, vpu y nef, y/o Tat, un transactivador primario del VIH. En algunos casos divulgados en el presente documento, los vectores lentivíricos, tales como los vectores lentivíricos basados en el VIH, comprenden solo tres genes del virus parental: gag, pol y rev, lo que reduce o elimina la posibilidad de reconstitución de un virus de tipo natural mediante recombinación.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el genoma del vector vírico se introduce en una estirpe celular de empaquetamiento que contiene todos los componentes necesarios para empaquetar el ARN genómico del virus, transcrito del genoma del vector vírico, en partículas víricas. Como alternativa, el genoma del vector vírico puede comprender uno o más genes que codifican componentes víricos además de la una o más secuencias, por ejemplo, ácidos nucleicos recombinantes, de interés. En algunos casos divulgados en el presente documento, para evitar la replicación del genoma en la célula diana, sin embargo, los genes víricos endógenos necesarios para la replicación se eliminan y se proporcionan por separado en la estirpe celular de empaquetamiento.

En algunos casos divulgados en el presente documento, se transfecta una estirpe celular de empaquetamiento con uno o más vectores plasmídicos que contienen los componentes necesarios para generar las partículas. En algunos casos divulgados en el presente documento, se transfecta una estirpe celular de empaquetamiento con un plásmido que contiene el genoma del vector vírico, incluyendo las LTR, la secuencia de empaquetamiento de acción en *cis* y la secuencia de interés, es decir, un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno, tal como un CAR; y uno o más plásmidos auxiliares que codifican los componentes enzimáticos y/o estructurales del virus, tales como Gag, pol y/o rev. En algunos casos divulgados en el presente documento, se utilizan múltiples vectores para separar los diversos componentes genéticos que generan las partículas de vector retrovílico. En algunos de estos casos divulgados en el presente documento, la provisión de vectores separados a la célula de empaquetamiento reduce la posibilidad de que se produzcan acontecimientos de recombinación que, de otro modo, podrían generar virus competentes para la replicación. En algunos casos divulgados en el presente documento, se puede usar un solo vector plasmídico que tiene todos los componentes retrovíricos.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la partícula de vector retrovílico, tal como una partícula de vector lentivílico, está pseudotipada para aumentar la eficacia de transducción de las células hospedadoras. Por ejemplo, una partícula de vector retrovílico, tal como una partícula de vector lentivílico, en algunos casos divulgados en el presente documento, está pseudotipada con una glucoproteína VSV-G, que proporciona una amplia variedad de hospedadores celulares que amplía los tipos de células que se pueden transducir. En algunos casos divulgados en el presente documento, se transfecta una estirpe celular de empaquetamiento con un plásmido o polinucleótido que codifica una glucoproteína de envoltura no natural, tal como para incluir envolturas xenotrópicas, politrópicas o anfotrópicas, tales como la envoltura del virus Sindbis, GALV o VSV-G.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la estirpe celular de empaquetamiento proporciona los componentes, incluyendo proteínas reguladoras y estructurales víricas, que se requieren en *trans* para el empaquetamiento del ARN genómico vírico en partículas de vector lentivílico. En algunos casos divulgados en el presente documento, la estirpe celular de empaquetamiento puede ser cualquier estirpe celular que sea capaz de expresar proteínas lentivíricas y producir partículas de vector lentivílico funcionales. En algunos casos divulgados en el presente documento, las estirpes celulares de empaquetamiento adecuadas incluyen células 293 (ATCC CCL X), 293T, HeLA (ATCC CCL 2), D17 (ATCC CCL 183), MDCK (ATCC CCL 34), BHK (ATCC CCL-10) y Cf2Th (ATCC CRL 1430).

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

En algunos casos divulgados en el presente documento, los vectores víricos y los plásmidos de empaquetamiento y/o auxiliares se introducen mediante transfección o infección en la estirpe celular de empaquetamiento. La estirpe celular de empaquetamiento produce partículas de vector vírico que contienen el genoma del vector vírico. Los métodos de

transfección o infección se conocen bien. Los ejemplos no limitantes incluyen fosfato de calcio, DEAE-dextrano y métodos de lipofección, electroporación y microinyección.

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

15 En algunos casos divulgados en el presente documento, un vector retrovítico, tal como un vector lentivítico, se puede
producir en una estirpe celular de empaquetamiento, tal como una estirpe celular HEK 293T de ejemplo, mediante la
introducción de plásmidos para permitir la generación de partículas lentivíricas. En algunos casos divulgados en el
presente documento, se transfecta una célula de empaquetamiento y/o contiene un polinucleótido que codifica gag y
pol, y un polinucleótido que codifica un receptor recombinante, tal como un receptor de antígeno, por ejemplo, un CAR.
En algunos casos divulgados en el presente documento, la estirpe celular de empaquetamiento se transfecta opcional
20 y/o adicionalmente con y/o contiene un polinucleótido que codifica una proteína rev. En algunos casos divulgados en
el presente documento, la estirpe celular de empaquetamiento se transfecta opcional y/o adicionalmente con y/o
contiene un polinucleótido que codifica una glucoproteína de envoltura no natural, tal como VSV-G. En algunos de
estos casos divulgados en el presente documento, aproximadamente dos días después de la transfección de las
células, por ejemplo, células HEK 293T, el sobrenadante celular contiene vectores lentivíricos recombinantes, que
25 pueden se recuperarse y valorar.

Las partículas de vectores retrovíticos recuperadas y/o producidas se pueden usar para transducir células diana
usando los métodos como se describe. Una vez en las células diana, el ARN vírico se transcribe inversamente, se
importa al núcleo y se integra de forma estable en el genoma del hospedador. Uno o dos días después de la integración
30 del ARN vírico, la expresión de la proteína recombinante, por ejemplo, el receptor de antígeno, tal como CAR, se
puede detectar.

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

En algunos casos divulgados en el presente documento, la concentración de células que se van a transducir de la
composición es de o de aproximadamente $1,0 \times 10^5$ células/ml a $1,0 \times 10^8$ células/ml, tal como al menos o
40 aproximadamente al menos o aproximadamente $1,0 \times 10^5$ células/ml, 5×10^5 células/ml, 1×10^6 células/ml, $5 \times$
 10^6 células/ml, 1×10^7 células/ml, 5×10^7 células/ml o 1×10^8 células/ml.

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

En algunos casos divulgados en el presente documento, el valor de las partículas de vector vírico 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,
50 tal 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.

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

En algunos casos divulgados en el presente documento, el método implica poner en contacto o incubar, las células
con las partículas víricas. En algunos casos divulgados en el presente documento, el contacto es de 30 minutos a
60 72 horas, tal como de 30 minutos a 48 horas, de 30 minutos a 24 horas o de 1 hora a 24 horas, tal como al menos o
aproximadamente al menos 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 36 horas o más.

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

5 ml a 10 ml, de 10 ml a 500 ml, de 10 ml a 200 ml, de 10 ml a 100 ml, de 10 ml a 50 ml, de 50 ml a 500 ml, de 50 ml a 200 ml, de 50 ml a 100 ml, de 100 ml a 500 ml, de 100 ml a 200 ml o de 200 ml a 500 ml.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el contacto puede efectuarse mediante centrifugación, tal como la espinoculación (por ejemplo, inoculación centrífuga). En algunos casos divulgados en el presente documento, la composición que contiene células, partículas víricas y reactivo pueden girar, generalmente a una fuerza o velocidad relativamente bajas, tal como una velocidad inferior a la usada para granular las células, tal como de o de aproximadamente 600 rpm a 1700 rpm (por ejemplo, a o aproximadamente o al menos 600 rpm, 1000 rpm, o 1500 rpm o 1700 rpm). En algunos casos divulgados en el presente documento, la rotación se lleva a una fuerza, por ejemplo, una fuerza centrífuga relativa, de o de aproximadamente 100 g a 3200 g (por ejemplo, a o aproximadamente o al menos a o aproximadamente 100 g, 200 g, 300 g, 400 g, 500 g, 1000 g, 1500 g, 2000 g, 2500 g, 3000 g o 3200 g), según lo medido, por ejemplo, en una pared interna o externa de la cámara o cavidad. La expresión "fuerza centrífuga relativa" o FCR se entiende generalmente como la fuerza efectiva impartida sobre un objeto o sustancia (tal como una célula, muestra o gránulo y/o un punto de la cámara u otro recipiente que se hace girar), respecto a la fuerza gravitatoria de la Tierra, en un punto concreto del espacio con respecto al eje de rotación. El valor puede determinarse mediante fórmulas ya conocidas, teniendo en cuenta la fuerza gravitatoria, la velocidad de rotación y el radio de rotación (distancia entre el eje de rotación y el objeto, sustancia o partícula en donde se mide la FCR).

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

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

2. Vectores no víricos

En algunos casos divulgados en el presente documento, los ácidos nucleicos recombinantes se transfieren a los linfocitos T a través de electroporación (véase, por ejemplo, Chicaybam *et al.*, (2013) PLoS ONE 8(3): e60298 y Van Tedeloo *et al.* (2000) Gene Therapy 7(16): 1431-1437). En algunos casos divulgados en el presente documento, los ácidos nucleicos recombinantes se transfieren a los linfocitos 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 las células inmunitarias incluyen la transfección con fosfato de calcio (por ejemplo, como se describe en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y.), fusión de protoplastos, transfección mediada por liposomas catiónicos; bombardeo de micropartículas facilitado por partículas de wolframio (Johnston, Nature, 346: 776-777 (1990)); y coprecipitación de ADN con fosfato de estroncio (Brash *et al.*, Mol. Cell Biol., 7: 2031-2034 (1987)).

Otros enfoques y vectores para la transferencia de los ácidos nucleicos que codifican los productos recombinantes son los descritos, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional, N.º de publicación: WO2014055668 y la Patente de EE. UU. N.º 7.446.190.

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

La transfección basada en transposones es un sistema de dos componentes formado por una transposasa y un transposón. En algunos casos divulgados en el presente documento, el sistema comprende un transposón genomanipulado para comprender un ADN exógeno (también denominado en el presente documento 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 reconocidas por una transposasa acompañante. En algunos casos divulgados en el presente documento, un plásmido no vírico codifica una transposasa bajo el control de un promotor. La transfección del plásmido en una célula hospedadora da lugar a una expresión transitoria de la transposasa, por lo tanto, durante un periodo inicial tras la transfección, la transposasa se expresa a niveles suficientes para integrar el transposón en el ADN genómico. En algunos casos divulgados en el presente documento, la propia transposasa no se integra en el ADN genómico, por lo que la expresión de la transposasa disminuye con el tiempo. En algunos casos divulgados en el presente documento, la expresión de la transposasa se expresa por la célula hospedadora a niveles suficientes para integrar un transposón correspondiente durante menos de aproximadamente 4 horas, menos de aproximadamente 8 horas, menos de aproximadamente 12 horas, menos de aproximadamente 24 horas, menos de

aproximadamente 2 días, menos de aproximadamente 3 días, menos de aproximadamente 4 días, menos de aproximadamente 5 días, menos de aproximadamente 6 días, menos de aproximadamente 7 días, menos de aproximadamente 2 semanas, menos de aproximadamente 3 semanas, menos de aproximadamente 4 semanas, menos de aproximadamente 5 semanas, o menos de aproximadamente 8 semanas. En algunos casos divulgados en el presente documento, el ADN de carga que se introduce en el genoma del hospedador no se elimina posteriormente del genoma del hospedador, al menos porque el hospedador no expresa una transposasa endógena capaz de escindir el ADN de carga.

Bella Durmiente (SB) es un miembro sintético de la superfamilia de transposones Tc/1-mariner, reconstruido a partir de elementos latentes albergados en el genoma de peces salmónidos. La transfección basada en transposones SB es un sistema de dos componentes que consiste en una transposasa y un transposón que contiene secuencias de repetición invertida/repetición directa (IR/DR) que dan lugar a una integración precisa en un dinucleótido TA. El transposón está diseñado con un casete de expresión de interés flanqueado por IR/DR. La transposasa SB se une a sitios de unión específicos que se encuentran en la IR del transposón Bella Durmiente. La transposasa SB media en la integración del transposón, un elemento móvil que codifica una secuencia de carga flanqueada a ambos lados por repeticiones terminales invertidas que albergan sitios de unión para la enzima catalítica (SB). La expresión estable resulta cuando SB inserta secuencias génicas en cromosomas de vertebrados en un dinucleótido diana TA mediante un mecanismo de cortar y pegar. Este sistema se ha usado para genomanipular una diversidad de tipos de células de vertebrados, incluyendo leucocitos primarios de sangre periférica humana. En algunos casos divulgados en el presente documento, 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 SB IR. En casos particulares divulgados en el presente documento, las células que se van a transfectar se ponen en contacto con, se incuban y/o se tratan con un plásmido que comprende un transposón SB con un gen de carga, por ejemplo, un gen que codifica un CAR, flanqueado por secuencias SB IR. En determinados casos divulgados en el presente documento, el plásmido comprende además un gen que codifica una transposasa SB que no está flanqueada por secuencias SB IR.

Se proporciona una secuencia SB IR de ejemplo por la SEQ ID NO: 26. Se proporcionan una secuencia polinucleotídica de ejemplo que codifica una transposasa SB, y una secuencia de aminoácidos de una transposasa SB de ejemplo por las SEQ ID NO: 24 y 25, respectivamente.

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

Se ilustra una secuencia PB IR de ejemplo por la SEQ ID NO: 27. Se ilustra una secuencia polinucleotídica de ejemplo que codifica una transposasa PB por la SEQ ID NO: 28. Se ilustra una secuencia de aminoácidos de una transposasa PB de ejemplo por la SEQ ID NO: 29.

En algunos casos divulgados en el presente documento, los diversos elementos del transposón/transposasa empleados en los métodos en cuestión, por ejemplo, uno o más vectores SB o PB, pueden producirse mediante métodos estándar de escisión por enzimas de restricción, ligadura y clonación molecular. Un protocolo para construir los vectores en cuestión incluye las siguientes etapas. En primer lugar, fragmentos purificados de ácido nucleico que contienen secuencias deseadas de nucleótidos de componentes, así como secuencias extrañas, se escinden con endonucleasas de restricción de fuentes iniciales, por ejemplo, un vector que comprende el gen de la transposasa. A continuación, los fragmentos que contienen las secuencias de nucleótidos deseadas se separan de los fragmentos no deseados de diferente tamaño mediante métodos de separación convencionales, por ejemplo, electroforesis en gel de agarosa. Los fragmentos deseados se escinden del gel y se ligan entre sí en la configuración adecuada, de modo que se produce un ácido nucleico circular o plásmido que contiene las secuencias deseadas, por ejemplo, secuencias correspondientes a los diversos elementos de los vectores en cuestión, como se ha descrito anteriormente. Cuando se desee, las moléculas circulares así construidas se amplifican a continuación en un hospedador procariota, por ejemplo, *E. coli*. Los procedimientos de escisión, construcción de plásmidos, transformación celular y producción de plásmidos implicados en estas etapas son bien conocidos por los expertos en la técnica y las enzimas necesarias para la restricción y la ligadura están disponibles comercialmente. (Véanse, por ejemplo, R. Wu, Ed., *Methods in Enzymology*, Vol. 68, Academic Press, N.Y. (1979); T. Maniatis, E. F. Fritsch y J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1982); Catálogo 1982-83, New

England Biolabs, Inc.; Catálogo 1982-83, Bethesda Research Laboratories, Inc. Se divulga un ejemplo de cómo construir los vectores empleados en los métodos en cuestión en la sección de Ejemplos, más adelante. La preparación de un sistema de transposón representativo Bella Durmiente también se divulga en los documentos WO 98/40510 y WO 99/25817).

En algunos casos divulgados en el presente documento, la transducción con transposones se realiza con un plásmido que comprende un gen de transposasa y un plásmido que comprende un transposón que contiene una secuencia de ADN de carga que está flanqueada por secuencias de repetición invertida/repetición directa (IR/DR) que son reconocidas por la transposasa. En determinados casos divulgados en el presente documento, la secuencia de ADN de carga codifica una proteína heteróloga, por ejemplo, un receptor recombinante de linfocitos T o un CAR. En algunos casos divulgados en el presente documento, el plásmido comprende la transposasa y el transposón. En algunos casos divulgados en el presente documento, la transposasa está bajo el control de un promotor ubicuo, o de cualquier promotor adecuado para dirigir la expresión de la transposasa en la célula diana. Los promotores ubicuos incluyen, pero sin limitación, EF1a, CMB, SV40, PGK1, Ubc, β -actina humana, CAG, TRE, UAS, Ac5, CaMKIIa y U6. En algunos casos divulgados en el presente documento, el ADN de carga comprende un casete de selección que permite la selección de células con integración estable del ADN de carga en el ADN genómico. Los casetes de selección adecuados incluyen, pero sin limitación, casetes de selección que codifican un gen de resistencia a la kanamicina, gen de resistencia a la espectinomicina, gen de resistencia a la estreptomycin, gen de resistencia a la ampicilina, gen de resistencia a la carbenicilina, gen de resistencia a la higromicina, gen de resistencia a bleomicina, gen de resistencia a la eritromicina y gen de resistencia a la polimixina B.

En algunos casos divulgados en el presente documento, 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 prever la introducción *in vitro* o *in vivo* de los componentes del sistema en la célula diana, en función de la ubicación de la célula diana. Por ejemplo, donde la célula objetivo es una célula aislada, el sistema puede introducirse directamente en la célula en condiciones de cultivo celular que permitan la viabilidad de la célula diana, por ejemplo, mediante técnicas de transformación estándar. Tales técnicas incluyen, pero no se limitan necesariamente a: infección vírica, transformación, conjugación, fusión de protoplastos, electroporación, tecnología de pistola de partículas, precipitación con fosfato de calcio, microinyección directa, suministro de vectores víricos y similares. La elección de método depende generalmente del tipo de célula que se esté transformando y de las circunstancias en las que esté teniendo lugar la transformación (es decir, *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*). Se puede encontrar un análisis general de estos métodos en Ausubel, *et al.*, Short Protocols in Molecular Biology, 3.^a Ed., Wiley & Sons, 1995.

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

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

Una vez que el ADN del vector ha entrado en la célula diana con relación a la transposasa necesaria, la región de ácido nucleico del vector que está flanqueada por repeticiones invertidas, es decir, el ácido nucleico de vector posicionado entre las repeticiones invertidas reconocidas por la transposasa Bella Durmiente, se escinde del vector mediante la transposasa suministrada y se inserta en el genoma de la célula diana. Como tal, la introducción del ADN vectorial en la célula diana va seguida de la posterior escisión mediada por transposasa y la inserción del ácido nucleico exógeno transportado por el vector en el genoma de la célula diana. En casos particulares divulgados en el presente documento, el vector se integra 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 transfectadas con el transposón SB y/o la transposasa SB. En algunos casos divulgados en el presente documento, la integración del ácido nucleico en el genoma de la célula diana es estable, es decir, el ácido nucleico del vector permanece presente en el genoma de la célula diana durante más de un período transitorio y transmite una parte del material genético cromosómico a la progenie de la célula diana.

En determinados casos divulgados en el presente documento, los transposones se usan para integrar ácidos

nucleicos, es decir, polinucleótidos, de diversos tamaños en el genoma de la célula diana. En algunos casos divulgados en el presente documento, el tamaño del ADN que se inserta en el genoma de una célula diana usando 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 kb a aproximadamente 200 kb, de aproximadamente 1,0 kb a aproximadamente 10 kb, de aproximadamente 10 kb a aproximadamente 50 kb, de aproximadamente 50 kb a aproximadamente 100 kb, o de aproximadamente 100 kb a aproximadamente 200 kb. En algunos casos divulgados en el presente documento, 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. En algunos casos divulgados en el presente documento, el tamaño del ADN que se inserta en el genoma de una célula diana usando los métodos en cuestión varía de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 200 kb. En casos particulares divulgados en el presente documento, 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 8,0 kb aproximadamente.

V. MÉTODOS DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

En el presente documento se divulgan métodos para detectar un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular que es un anticuerpo anti BCMA poniendo en contacto una composición o muestra biológica que contiene células que expresan el CAR (células que expresan CAR) con una proteína de fusión BCMA-Fc. En algunos casos divulgados en el presente documento, el método incluye además detectar si se forma un complejo entre la proteína de fusión BCMA-Fc y el CAR expresado por o en las células en la composición o muestra biológica, tal como detectar la presencia o ausencia o el nivel de dicha unión. En algunos casos divulgados en el presente documento, la detección comprende detectar células unidas con la fusión BCMA-Fc. En algunos casos divulgados en el presente documento, la fusión BCMA-Fc está marcada directa o indirectamente para su detección.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el antígeno BCMA de la proteína de fusión BCMA-Fc es o comprende un dominio extracelular de BCMA o una porción del mismo que comprende un epítipo reconocido por un receptor de antígeno, por ejemplo, CAR. En determinados casos divulgados en el presente documento, la proteína de fusión BCMA-Fc recombinante contiene un antígeno BCMA que contiene el dominio extracelular de un BCMA humano o una porción del mismo que es o contiene un epítipo reconocido por el CAR. En algunos casos divulgados en el presente documento, el antígeno BCMA de la fusión BCMA-Fc no contiene un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático de BCMA humano natural. Por lo tanto, en algunos casos divulgados en el presente documento, el antígeno BCMA de la fusión BCMA-Fc es, consiste o consiste esencialmente en el dominio extracelular o una porción del mismo de un BCMA humano natural. En algunos casos divulgados en el presente documento, el antígeno BCMA de la proteína de fusión BCMA-Fc es o comprende, en algunos casos consiste o consiste esencialmente en, un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 o es un fragmento de la misma que contiene al menos 50, al menos 55, al menos 60, al menos 65, al menos 70, al menos 75, al menos 80, al menos 85, al menos 90, al menos 95, al menos 100, al menos 110, al menos 120, al menos 130, al menos 140, al menos 150, al menos 160, al menos 170 o al menos 180 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 1 que es reconocido o está unido específicamente por el dominio de unión a antígeno del CAR. En algunos casos divulgados en el presente documento, el antígeno BCMA es o comprende, en algunos casos consiste o consiste esencialmente en, la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1 o una porción de la misma que es o contiene un epítipo reconocido por un receptor de antígeno, por ejemplo, CAR.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el antígeno BCMA recombinante o porción del mismo se fusiona directa o indirectamente a una región o dominio constante de inmunoglobulina, tal como, por ejemplo, el dominio Fc o porciones del mismo de IgG, incluyendo los subtipos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, IgA, IgE, IgD e IgM y formas modificadas de las mismas. En casos particulares divulgados en el presente documento, el antígeno BCMA está unido, directa o indirectamente, a un dominio Fc. En algunos casos divulgados en el presente documento, el polipéptido es un polipéptido de fusión que comprende el antígeno BCMA o una porción del mismo y el dominio Fc.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc está compuesto por el segundo y tercer dominios constantes (es decir, dominios CH2 y CH3) de la cadena pesada de un isotipo IgG, IgA o IgD, por ejemplo, CH2 o CH3 de los isotipos IgG, IgA e IgD. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc está compuesto por tres dominios constantes de cadena pesada (es decir, dominios CH2, CH3 y CH4) de un isotipo IgM o IgE. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc puede incluir además una secuencia bisagra o una porción de la misma. En determinados casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc contiene parte o la totalidad de un dominio bisagra de una molécula de inmunoglobulina más un dominio CH2 y un dominio CH3. En algunos casos, el dominio Fc puede formar un dímero de dos cadenas polipeptídicas unidas por uno o más enlaces disulfuro. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc procede de una inmunoglobulina (por ejemplo, IgG, IgA, IgM o IgE) de un mamífero adecuado (por ejemplo, ser humano, ratón, rata, cabra, oveja o mono). En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc comprende los dominios CH2 y CH3 de IgG. En determinados casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc está fusionado al extremo C del antígeno BCMA. En casos particulares divulgados en el presente documento, el dominio Fc está fusionado al extremo N del antígeno BCMA.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG, o una porción o variante del mismo. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG humana, o una porción o una variante del mismo, que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2. En casos particulares divulgados en el presente documento, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG humana de tipo natural, o una porción o variante del mismo. En casos particulares divulgados en el presente documento, el dominio Fc es una variante del dominio Fc de IgG1 humana de tipo natural.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el polipéptido de fusión comprende un dominio Fc variante. En determinados casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc de IgG humana variante contiene una mutación, por ejemplo, una sustitución, delección o inserción, que reduce, disminuye y/o disminuye el emparejamiento entre el dominio Fc y una cadena ligera. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc de IgG humana variante contiene una mutación que reduce la afinidad de unión entre el dominio Fc y un receptor Fc. En casos particulares divulgados en el presente documento, el dominio Fc de IgG humana variante contiene una mutación que reduce, disminuye y/o disminuye las interacciones, o la probabilidad o posibilidad de una interacción, entre el dominio Fc y un receptor Fc. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc de IgG humana variante contiene una mutación que reduce la afinidad de unión entre el dominio Fc y una proteína del sistema del complemento. En casos particulares divulgados en el presente documento, el dominio Fc de IgG humana variante contiene una mutación que reduce, disminuye y/o disminuye las interacciones, o la probabilidad o posibilidad de una interacción, entre el dominio Fc y una proteína del sistema del complemento.

En algunos casos divulgados en el presente documento, BCMA-Fc comprende un dominio Fc de IgG1 humana variante. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc de IgG humana variante contiene una sustitución de cistina por serina en la región bisagra del dominio Fc. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc de IgG humana variante contiene una sustitución de leucina por alanina en la región bisagra del dominio Fc. En casos particulares divulgados en el presente documento, el dominio Fc de IgG humana variante contiene una sustitución de glicina por alanina en la región bisagra. En determinados casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc de IgG humana variante contiene una sustitución de alanina por serina en la región CH2 del dominio Fc. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc de IgG humana variante comprende una sustitución de prolina por serina en la región CH2 del dominio Fc. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc de IgG humana variante comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 28.

En algunos casos divulgados en el presente documento, BCMA-Fc comprende un polipéptido de fusión que comprende un dominio Fc, en donde el dominio Fc está presente en el extremo C del polipéptido de fusión.

En algunos casos divulgados en el presente documento, BCMA-Fc es un polipéptido de fusión que comprende un polipéptido BCMA, o una porción del mismo, y un dominio Fc. En algunos casos divulgados en el presente documento, el polipéptido BCMA o una porción del mismo comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % con la SEQ ID NO: 1 y contiene un epítipo reconocido por el receptor de antígeno, por ejemplo, el CAR. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2 o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2. En algunos casos divulgados en el presente documento, el dominio Fc comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 28 o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % con respecto a la SEQ ID NO: 28. En algunos casos divulgados en el presente documento, el antígeno BCMA incluye BCMA, o una porción o variante del mismo, y una etiqueta o un dominio de fusión, por ejemplo, un dominio Fc. En casos particulares divulgados en el presente documento, el antígeno BCMA contiene toda o una porción de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 35 o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % con respecto a la SEQ ID NO: 35, y que comprende un epítipo reconocido por un receptor de antígeno, por ejemplo, CAR.

En algunos casos divulgados en el presente documento, BCMA-F es un dímero que comprende dos o más antígenos BCMA como se describe, que cada uno es reconocido y/o está unido por un CAR. En algunos casos divulgados en el presente documento, los antígenos BCMA son idénticos.

En determinados casos divulgados en el presente documento, los métodos para detectar células que expresan CAR con una fusión BCMA-Fc descrita en el presente documento se usan para evaluar las células que expresan CAR en un sujeto. En algunos casos divulgados en el presente documento hay métodos de uso para la fusión BCMA-Fc para evaluar, medir y/o cuantificar la farmacocinética *in vivo*, la expansión y/o la persistencia de células que expresan CAR de una composición celular terapéutica. En algunos casos divulgados en el presente documento, la farmacocinética

in vivo, expansión y/o persistencia de las células, y/o cambios en los fenotipos celulares o la actividad funcional de las células, tal como las células que expresan CAR administradas para inmunoterapia, por ejemplo, terapia con linfocitos T con CAR, en los métodos divulgados en el presente documento, se pueden medir con la proteína de fusión BCMA-Fc. En algunos casos divulgados en el presente documento, la farmacocinética, la expansión y/o la persistencia de las células que expresan CAR se miden o se evalúan detectando la presencia y/o la cantidad de células que expresan CAR en el sujeto y/o en una muestra biológica obtenida del sujeto después de la administración de la composición celular terapéutica durante y/o después de la administración de la terapia.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la fusión BCMA-Fc se usa con citometría de flujo para evaluar la cantidad de células que expresan CAR en la muestra de sangre o suero o de tejido u órgano (por ejemplo, sitio de la enfermedad, por ejemplo, muestra de tumor) del sujeto. En algunos casos divulgados en el presente documento, la persistencia se cuantifica como el número de células que expresan CAR por microlitro de la muestra, por ejemplo, de sangre o suero, o por número total de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o glóbulos blancos o linfocitos T por microlitro de la muestra. En determinados casos divulgados en el presente documento, la expansión se cuantifica como el aumento del número de células que expresan CAR por microlitro entre muestras, por ejemplo, de sangre o suero, o por número total de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o glóbulos blancos o linfocitos T por microlitro de las muestras en el tiempo. En algunos casos divulgados en el presente documento, la farmacocinética, la expansión y/o la persistencia se miden o se evalúan detectando la cantidad de células que expresan CAR en el sujeto y/o en muestras recogidas del sujeto en múltiples puntos temporales. En determinados casos divulgados en el presente documento, la una o más muestras se recogen, se obtienen y/o se extraen del sujeto en un plazo de 24 horas, 48 horas, 72 horas, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 10 días, 14 días, 21 días, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 9 semanas, 10 semanas, 11 semanas, 12 semanas, 3 meses, 4 meses, 6 meses, un año o más de un año después de que se administra la composición celular terapéutica.

En algunos casos divulgados en el presente documento, se divulga un método para evaluar una terapia con linfocitos T con CAR anti BCMA en un individuo, en donde el CAR comprende un anticuerpo anti BCMA o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y el método comprende incubar una muestra del sujeto con una proteína de fusión BCMA-Fc y determinar la cantidad de linfocitos T unidos con la proteína de fusión BCMA-Fc. En algunos casos divulgados en el presente documento, la fusión BCMA-Fc se marca y los linfocitos T unidos a la fusión BCMA-Fc se ensayan mediante citometría de flujo. En algunos casos divulgados en el presente documento, la muestra es una muestra procedente de sangre, o es o procede de un producto de aféresis o leucocitaféresis. En algunos casos divulgados en el presente documento, la administración se realiza tras el inicio de una primera dosis de la terapia.

En un caso divulgado en el presente documento, se usa un BCMA-Fc para determinar si es necesario un ajuste de una terapia con linfocitos T con CAR en un individuo, por ejemplo, cuando niveles bajos de linfocitos T con CAR en el individuo indican la necesidad de ajustar la terapia. En algunos casos divulgados en el presente documento, la terapia se ajusta (i) si el número de células de la terapia con linfocitos T es detectable en la sangre u otra muestra biológica, después de haber sido detectable, no es detectable o se ha reducido, opcionalmente reducido en comparación con un punto de tiempo anterior después de la administración de la terapia con linfocitos T; (ii) el número de células de la terapia con linfocitos T detectables en la sangre u otra muestra biológica se reduce en o más de 1,5 veces, 2,0 veces, 3,0 veces, 4,0 veces, 5,0 veces, 10 veces o más el pico o número máximo de células de la terapia con linfocitos T detectable en la sangre o la muestra biológica del sujeto después del inicio de la administración de la terapia con linfocitos T, opcionalmente la primera, la segunda dosis o las dosis posteriores; (iii) en un momento posterior a que se detecte un pico o nivel máximo de células de la terapia con linfocitos T en la sangre del sujeto, el número de células de o procedentes de los linfocitos T detectables en la sangre del sujeto es inferior al 10 %, inferior al 5 %, inferior al 1 % o inferior al 0,1 % del total de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en la sangre del sujeto; y/o (iv) si el número de células CD3+ o CD8+ de la terapia celular detectable en la sangre es inferior a 20 células por μ l, 15 células por μ l, 10 células por μ l, inferior a 5 células por μ l o inferior a 1 célula por μ l. En algunos casos divulgados en el presente documento, la terapia se ajusta administrando una o más dosis adicionales de la terapia con linfocitos T con CAR, administrando una dosis mayor de la terapia con linfocitos T con CAR, administrando una terapia alternativa con linfocitos T con CAR específica para el mismo antígeno o para uno diferente, administrando uno o más agentes inmunomoduladores u otro agente para promover o aumentar la expansión o persistencia de los linfocitos T con CAR.

Se pueden usar diversos métodos conocidos en la técnica para detectar la unión de una fusión BCMA-Fc a células que expresan CAR. En algunos casos divulgados en el presente documento, el método incluye citometría de flujo o un inmunoensayo. Un resto indicador o un grupo de marcaje, se puede unir a la fusión BCMA-Fc y se selecciona de modo que satisfaga las necesidades de diversos usos del método que a menudo están dictados por la disponibilidad de los equipos de ensayo y los procedimientos de inmunoensayo compatibles. En algunos casos divulgados en el presente documento, la etiqueta se selecciona de restos o proteínas fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, GFP o BFP) o restos luminiscentes (por ejemplo, nanopartículas Qdot™ suministradas por Quantum Dot Corporation, Palo Alto, Calif.). Se conocen diversas técnicas generales que se pueden usar para realizar los diversos inmunoensayos mencionados anteriormente.

En algunos casos divulgados en el presente documento, las fusiones BCMA-Fc no necesitan estar marcadas, y su presencia se puede detectar usando un anticuerpo marcado que se une a la fusión BCMA-Fc. En algunos casos

divulgados en el presente documento, el anticuerpo marcado es específico para la porción Fc de la molécula.

En algunos casos divulgados en el presente documento, la fusión BCMA-Fc está inmovilizada o unida a un soporte sólido, en donde una composición o muestra biológica que contiene una o más células diana que comprenden linfocitos T con CAR se ponen en contacto con el soporte sólido. En algunos casos divulgados en el presente documento, el soporte sólido es una perla. En algunos casos divulgados en el presente documento, el soporte sólido es la superficie de un pocillo o placa, por ejemplo, una placa de cultivo celular. En algunos casos divulgados en el presente documento, el soporte sólido es una resina o matriz presente o contenida en una columna de cromatografía, por ejemplo, para permitir el aislamiento cromatográfico o la selección de linfocitos T con CAR+. En algunos casos divulgados en el presente documento, la proteína de fusión BCMA-Fc está o es capaz de estar unida de manera reversible a un soporte sólido. En algunos casos divulgados en el presente documento, el soporte sólido es una matriz de cromatografía de afinidad que comprende uno o más sitios de unión capaces de unirse, por ejemplo, unirse de manera reversible, a un compañero de unión presente en la proteína de fusión BCMA-Fc. En un ejemplo de ejemplo divulgado en el presente documento, la proteína de fusión BCMA-Fc comprende un péptido de unión a estreptavidina u otro resto de unión a estreptavidina capaz de unirse a una molécula de estreptavidina o muteína de estreptavidina presente o inmovilizada en el soporte sólido, que, en algunos casos, puede disociarse en presencia de una sustancia de competencia, tal como biotina. Los ejemplos de tales sistemas incluyen los descritos en la solicitud de patente publicada de EE. UU. N.º US20150024411.

VI. ARTÍCULOS DE FABRICACIÓN Y KITS

En algunos casos divulgados en el presente documento, también se divulgan sistemas, aparatos y kits útiles para realizar los métodos divulgados. En algunos casos se divulgan en el presente documento artículos de fabricación, tales como kits o dispositivos, que contienen las partículas, por ejemplo, perlas, descritas en el presente documento, es decir, partículas, por ejemplo, perlas, con moléculas de unión adheridas. En algunos casos divulgados en el presente documento, las moléculas de unión comprenden un antígeno o un anticuerpo que se une a o reconoce un receptor recombinante o un CAR. En algunos casos divulgados en el presente documento, los kits se pueden usar en métodos para expandir, seleccionar y/o enriquecer células, tal como de acuerdo con la preparación de células genomanipuladas para terapia celular adoptiva. En casos particulares divulgados en el presente documento, las células genomanipuladas expresan un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR, que está unido por o es reconocido por las moléculas de unión adheridas.

En algunos casos divulgados en el presente documento, los artículos de fabricación incluyen uno o más recipientes, típicamente una pluralidad de recipientes, material de envasado, y una etiqueta o prospecto en el recipiente o recipientes y/o envasado, o asociado a ellos, que generalmente incluyen instrucciones para expandir células, tales como células de un sujeto que se transducen o se transfectan con uno o más ácidos nucleicos, por ejemplo, uno o más ácidos nucleicos que comprenden un gen que codifica un receptor recombinante o CAR.

En determinados casos divulgados en el presente documento, el kit comprende además instrucciones para usar las partículas, por ejemplo, perlas, descritas en el presente documento para seleccionar o enriquecer células que expresan un receptor recombinante de una población de células. En algunos casos divulgados en el presente documento, el kit comprende instrucciones para usar las partículas, por ejemplo, perlas, descritas en el presente documento para enriquecer células que expresan un CAR. En casos particulares divulgados en el presente documento, el kit comprende instrucciones para incubar, poner en contacto o tratar una composición que comprende células con las partículas, por ejemplo, perlas, descritas en el presente documento, donde menos de la totalidad de las células expresan el CAR. En algunos casos divulgados en el presente documento, el kit comprende instrucciones para activar, expandir y/o enriquecer células que expresan un CAR. En determinados casos divulgados en el presente documento, el kit comprende instrucciones para activar, expandir y/o enriquecer células que expresan un CAR a partir de una población de células donde menos del 0,01 %, menos del 0,1 %, menos del 1 %, menos del 5 %, menos del 10 %, menos del 15 %, menos del 20 %, menos del 25 %, menos del 30 %, menos del 35 %, menos del 40 %, menos del 45 %, menos del 50 %, menos del 55 %, menos del 60 %, menos del 65 %, menos del 70 %, menos del 80 % o menos del 90 % de las células expresan el CAR.

En algunos casos divulgados en el presente documento, el kit contiene además instrucciones para transfectar o transducir células con uno o más ácidos nucleicos que codifican un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR, que no se han expandido, activado y/o enriquecido antes de la transfección o la transducción, poniendo en contacto, incubando o tratando las células con las partículas, por ejemplo, perlas, descritas en el presente documento.

VII. DEFINICIONES

A menos que se defina lo contrario, todos los términos de la técnica, notaciones y otros términos o terminología técnica y científica usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la materia objeto reivindicada. En algunos casos, los términos con significados comúnmente entendidos se definen en el presente documento para mayor claridad y/o para tener una referencia inmediata, y la inclusión de dichas definiciones en el presente documento no debe interpretarse necesariamente como una diferencia sustancial con respecto a lo que generalmente se entiende en la técnica.

Como se usa en el presente documento, la referencia a una "forma correspondiente" de un anticuerpo significa que cuando se compara una propiedad o actividad de dos anticuerpos, la propiedad se compara usando la misma forma del anticuerpo. Por ejemplo, si se establece que un anticuerpo tiene mayor actividad en comparación con la actividad de la forma correspondiente de un primer anticuerpo, eso significa que una forma particular, tal como un scFv de ese anticuerpo, tiene mayor actividad en comparación con la forma scFv del primer anticuerpo.

Como se usa en el presente documento, cuando se dice que las posiciones de los nucleótidos o de los aminoácidos "corresponden a" posiciones de nucleótidos o de aminoácidos en una secuencia divulgada, como se expone en el listado de secuencias, se entiende que se refiere a las posiciones de los nucleótidos o de los aminoácidos que se han identificado después de la alineación con la secuencia divulgada para maximizar la identidad, usando un algoritmo de alineación estándar, tal como el algoritmo GAP. Alineando las secuencias, un experto en la técnica puede identificar los residuos correspondientes, por ejemplo, usando como guía residuos de aminoácidos conservados e idénticos. En general, para identificar las posiciones correspondientes, las secuencias de aminoácidos se alinean de manera que se obtenga la coincidencia de mayor orden (véanse, por ejemplo: Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte I, Griffin, A.M. y Griffin, H.G., 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).

Las "funciones efectoras" se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, por sus siglas en inglés); unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación negativa de receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B); y activación de linfocitos B.

La expresión "región Fc" en el presente documento se usa para definir una región en el extremo C de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. La expresión incluye regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. En una realización, una región Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226 o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina del extremo C (Lys447) de la región Fc puede estar presente o no. A menos que se especifique lo contrario en el presente documento, la numeración de los residuos de aminoácidos en la región Fc o la región constante es según el sistema de numeración EU, también denominado índice EU, como se describe en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Las expresiones "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo inalterado", y "anticuerpo completo" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo natural o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc como se define en el presente documento.

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha separado de un componente de su entorno natural. En algunas realizaciones, un anticuerpo se purifica hasta una pureza superior al 95 % o 99 % como se determina mediante, por ejemplo, electroforesis (por ejemplo, SDS-PAGE, isoelectroenfoque (IEF), electroforesis capilar) o cromatografía (por ejemplo, HPLC de intercambio iónico o de fase inversa). Para una revisión de los métodos para evaluar la pureza de los anticuerpos, véase, por ejemplo, Flatman *et al.*, J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007).

Un ácido nucleico "aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha separado de un componente de su entorno natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que normalmente contienen la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente extracromosómicamente o en una ubicación cromosómica que es diferente de su ubicación cromosómica natural.

"Ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo antiidiotipo" se refiere a una o más moléculas de ácido nucleico que codifican cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos (o fragmentos de las mismas), incluyendo dicha una o más moléculas de ácido nucleico en un único vector o en vectores separados y dicha una o más moléculas de ácido nucleico presentes en una o más ubicaciones en una célula hospedadora.

Las expresiones "célula hospedadora", "estirpe celular hospedadora", y "cultivo de células hospedadoras" se usan indistintamente y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células hospedadoras incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen la célula primaria transformada y la descendencia procedente 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 precursora, sino que puede contener mutaciones. En el presente documento se incluye la descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada o seleccionada en la célula transformada originalmente.

Como se usa en el presente documento, "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" y "porcentaje de

identidad" cuando se usan con respecto a una secuencia de aminoácidos (secuencia polipeptídica de referencia) se definen como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata (por ejemplo, el anticuerpo o fragmento del sujeto) que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia polipeptídica de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede lograr de varias maneras que se encuentran dentro de la experiencia en la técnica, por ejemplo, usando software informático disponible públicamente tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros adecuados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se estén comparando.

Una sustitución de aminoácidos puede incluir la sustitución de un aminoácido en un polipéptido por otro aminoácido. La sustitución puede ser una sustitución de aminoácidos conservadora o una sustitución de aminoácidos no conservadora. Las sustituciones de aminoácidos pueden introducirse en una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo, de interés y los productos pueden cribarse para determinar una actividad deseada, por ejemplo, unión a antígeno conservada/mejorada, inmunogenicidad reducida o ADCC o CDC mejoradas.

Los aminoácidos generalmente pueden agruparse de acuerdo con las siguientes propiedades comunes de la cadena lateral:

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

En algunas realizaciones, las sustituciones conservadoras pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase. En algunas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos no conservadoras pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase. Las sustituciones de aminoácidos no conservadoras implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

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

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

A lo largo de la presente divulgación, diversos aspectos de la materia objeto reivindicada se presentan en un formato de intervalo. Ha de comprenderse que la descripción en formato de intervalo es meramente por conveniencia y brevedad, y no debe interpretarse como una limitación inflexible del alcance de la materia objeto reivindicada. Por consiguiente, debe considerarse que la descripción de un intervalo ha divulgado específicamente todos los subintervalos posibles, así como los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor afirmado o que interviene en el intervalo comentado queda englobado dentro de la materia objeto reivindicada. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños, y también se incluyen en la materia objeto reivindicada, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen alguno o ambos de los límites incluidos también quedan incluidos en la materia objeto reivindicada. Esto es aplicable independientemente de la amplitud del intervalo.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se refiere al intervalo de error habitual para el valor correspondiente, fácilmente conocido por los expertos en este campo técnico. La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) realizaciones que se refieren a ese valor o parámetro en sí. Por ejemplo, una descripción que hace referencia a "aproximadamente X" incluye la descripción de "X". En algunas realizaciones, "aproximadamente" se refiere a dentro de $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ o $\pm 1\%$ del valor o parámetro.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos, y no se limitan a una longitud mínima. Los polipéptidos, incluidos los anticuerpos y las cadenas de anticuerpos y otros péptidos proporcionados, por ejemplo, enlazadores, pueden incluir residuos de aminoácidos que

incluyen residuos de aminoácidos naturales y/o no naturales. Los términos también incluyen modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, por ejemplo, glucosilación, sialilación, acetilación, fosforilación y similares. En algunos aspectos, los polipéptidos pueden contener modificaciones con respecto a una secuencia nativa o natural, siempre que la proteína mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como mediante mutagénesis dirigida, o pueden ser accidentales, tal como mediante mutaciones de hospedadores que producen las proteínas o errores debidos a la amplificación por la PCR.

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

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 en la célula de un marcador particular, típicamente un marcador de superficie. Cuando se hace referencia a un marcador de superficie, el término se refiere a la presencia de expresión de superficie detectada por citometría de flujo, por ejemplo, mediante tinción con un anticuerpo que se une específicamente al marcador y detectando dicho anticuerpo, en donde la tinción es detectable por citometría de flujo a un nivel sustancialmente superior a la tinción detectada realizando el mismo procedimiento con un control de isotipo coincidente en condiciones por lo demás idénticas y/o a un nivel sustancialmente similar al de una célula que se sabe que es positiva para el marcador, y/o a un nivel sustancialmente superior al de una célula que se sabe que es negativa para el marcador.

Como se usa en el presente documento, una afirmación de que una célula o población celular es "negativa" para un marcador en particular se refiere a la ausencia de presencia sustancial detectable sobre o en la célula de un marcador particular, típicamente un marcador de superficie. Cuando se hace referencia a un marcador de superficie, el término se refiere a la ausencia de expresión superficial detectada por citometría de flujo, por ejemplo, mediante tinción con un anticuerpo que se une específicamente al marcador y detectando dicho anticuerpo, en donde la tinción no es detectada por citometría de flujo a un nivel sustancialmente por encima de la tinción detectada realizando el mismo procedimiento con un control de isotipo coincidente en condiciones por lo demás idénticas, y/o en un nivel sustancialmente menor que el de la célula que se sabe que es positiva para el marcador, y/o en un nivel sustancialmente similar en comparación con el de una célula que se sabe que es negativa para el marcador.

IX. Ejemplos

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

Ejemplo 1: Generación de perlas conjugadas con BCMA

El antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA) se conjugó con perlas mediante el acoplamiento covalente de un polipéptido de fusión BCMA-Fc, que contenía BCMA humano soluble fusionado en su extremo C a una región Fc de IgG, a la superficie de perlas magnéticas activadas con tosilo disponibles comercialmente (ThermoFisher, Waltham MA). Las perlas son perlas activadas con tosilo, monodispersas, no porosas y superparamagnéticas que se unen covalentemente a grupos amino primario y sulfhidrilo. La conjugación se realizó usando perlas que tenían un diámetro de aproximadamente 2,8 µm (designadas M-280) o 4,5 µm (designadas M-450).

BCMA-Fc (SEQ ID NO: 35) contenía el dominio extracelular del BCMA humano (N.º de GenBank NP_001183.2) y un Fc de IgG1 humana conectado con un enlazador de la siguiente manera:

MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNA (dominio extracelular de BCMA; SEQ ID NO: 1)
GGGS (enlazador; SEQ ID NO: 27)

PKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPVLDSDGSFELYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK (Fc de IgG1 hum; SEQ ID NO: 28)

El clon que codifica la construcción de fusión BCMA-Fc humana recombinante con la secuencia líder CD33 en el extremo N (SEQ ID NO: 30) se insertó en un vector de expresión y se expresó en células HEK 293. El sobrenadante de las células HEK transfectadas transitoriamente se recogió después de 5 días y la proteína de fusión BCMA-Fc se purificó mediante cromatografía de afinidad de proteína A y cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Se determinó que la proteína de fusión BCMA-Fc resultante tenía una pureza superior al 95 %, según se evaluó mediante

cromatografía de permeación en gel. Para ensayar la unión, la proteína de fusión BCMA-Fc se incubó con linfocitos T que expresaban CAR anti BCMA y linfocitos T que expresaban CAR que no se unían a BCMA. Los resultados de la citometría de flujo indicaron que la proteína de fusión BCMA-Fc se unía específicamente a los linfocitos T que expresaban CAR anti BCMA.

Se añadieron diversas concentraciones de la proteína de fusión BCMA-Fc que variaban de 5 µg a 200 µg a aproximadamente 1 ml de perlas activadas con tosilo (por ejemplo, que contenían aproximadamente 4×10^9 perlas activadas con tosilo que tenían un diámetro de 2,8 µm o aproximadamente 4×10^8 perlas activadas con tosilo que tenían un diámetro de 4,5 µm). El acoplamiento covalente se realizó mediante incubación durante una noche a 37 °C en una solución tamponada con fosfato (PBS) que contenía seroalbúmina humana (HSA) 0,1 %. Las perlas se lavaron y se suspendieron de nuevo en 1 ml de PBS con HSA al 0,1 %. Antes y después de la conjugación, la concentración de perlas se determinó usando un celómetro. El porcentaje de antígeno BCMA-Fc que se acopló a las perlas se determinó mediante análisis de SDS-page. En los ejemplos a continuación, las perlas conjugadas con BCMA usadas en diversos estudios se mencionan con referencia a la cantidad de antígeno BCMA-Fc añadido por ml o a la concentración de antígeno (µg/ml) durante la conjugación, por ejemplo, 5 µg o 5 µg/ml; 50 µg o 50 µg/ml; 200 µg o 200 µg/ml, etc.

Para algunos de los estudios descritos a continuación, las perlas se conjugaron de forma dual con BCMA-Fc y un anticuerpo anti CD28 en una relación de 1:1 usando los procedimientos sustancialmente como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 2: Estimulación con perlas conjugadas con anticuerpo anti BCMA de linfocitos T con CAR

Las perlas conjugadas con BCMA (diámetro de 4,5 µm), generadas como se describe en el Ejemplo 1, se incubaron con linfocitos T que expresaban CAR anti BCMA. Los linfocitos T se aislaron mediante enriquecimiento basado en inmunoafinidad a partir de muestras de leucofóresis de donantes sanos. Los linfocitos T aislados se transdujeron con un vector vírico que codifica uno de dos CAR anti BCMA, cada uno de los cuales contiene un dominio de unión a antígeno scFv diferente específico para BCMA, un espaciador, una región transmembrana de CD28, una región de señalización coestimuladora de 4-1BB y un dominio de señalización intracelular procedente de CD3-zeta (designado como CAR anti BCMA n.º 1 y CAR anti BCMA n.º 2, que difieren solo en la porción scFv). La construcción del vector vírico codificó además un EGFR truncado (EGFRt), que sirvió como marcador sustituto de la expresión de CAR; la región codificante de EGFRt se separó de la secuencia de CAR mediante una secuencia de salto T2A. Después de la transducción, las células se expandieron, se formularon en una relación de linfocitos T CD4⁺ con CAR⁺ con respecto a linfocitos T CD8⁺ con CAR⁺ de aproximadamente 1:1 y las composiciones resultantes se congelaron por crioconservación. Para los estudios descritos, la eficiencia de transducción de las composiciones de linfocitos T que expresaban CAR anti BCMA n.º 1 y CAR anti BCMA n.º 2 fue del 45 % o del 56 %, respectivamente, según se determinó usando un anticuerpo anti EGFR para la detección del marcador sustituto EGFRt.

La composición de linfocitos T que contenía linfocitos T con CAR⁺ anti BCMA se descongeló, se añadieron perlas de una composición de perlas conjugadas con BCMA de 100 µg/ml a las células en una relación de perlas:células de 1:1 y se incubaron durante cinco días. Como control positivo, las células se cultivaron con perlas anti CD3/anti CD28 en una relación de perlas:células de 1:1 durante cinco días. Los linfocitos T que no expresaban un CAR (grupo de estudio simulado) también se evaluaron después de la incubación con las perlas conjugadas con BCMA.

Para evaluar la proliferación, la composición celular que contenía linfocitos T que expresaban CAR anti BCMA se marcó con el colorante marcador de proliferación CELLTRACE VIOLET (CTV; ThermoFisher Scientific, Waltham MA) de acuerdo con el protocolo del fabricante antes de la incubación con las perlas conjugadas con BCMA. Los resultados de ejemplo que se muestran en la figura 1 demostraron que la incubación con perlas conjugadas con BCMA dio como resultado una intensidad fluorescente reducida del tinte CTV en los linfocitos T CD3⁺, lo que indica una dilución del colorante de proliferación representativo del grado de proliferación de acuerdo con el número de divisiones celulares. Para las células simuladas, muy pocos linfocitos T CD3⁺ sobrevivieron después de la incubación y no se observó ninguna disminución en la intensidad de CTV para las células simuladas que no expresaban un CAR anti BCMA. Estos datos indicaron que la incubación con perlas conjugadas con BCMA aumentó específicamente la proliferación celular en los linfocitos T que expresaban CAR anti BCMA.

Para evaluar si la expansión de los linfocitos T con CAR⁺ se enriqueció específicamente después de la incubación con perlas conjugadas con BCMA, las células de la composición de linfocitos T se tiñeron para determinar la expresión superficial de CD4 o CD8 y para determinar la expresión del marcador de transducción EGFRt usando un anticuerpo anti EGFR, y se analizaron por citometría de flujo. El grado de enriquecimiento de los linfocitos T con CAR⁺ (según lo detectado por la expresión del marcador sustituto EGFRt) después de la incubación con perlas conjugadas con BCMA se comparó con el enriquecimiento después de la estimulación policlonal usando las perlas anti CD3/anti CD28. El grado de proliferación celular (según lo determinado por la dilución en la intensidad de tinción del colorante de proliferación CTV) y el grado de activación (según lo determinado por la expresión superficial de CD25 o PD-1) también se compararon en las composiciones de linfocitos T incubadas con perlas conjugadas con BCMA o las perlas anti CD3/anti CD28 de control.

Como se muestra en la Tabla E1, la incubación de composiciones de linfocitos T que contenían linfocitos T con CAR+ anti BCMA con perlas conjugadas con BCMA durante cinco días dio como resultado un mayor porcentaje de células CD4+ y células CD8+ que expresan EGFRt en comparación con la incubación de las mismas composiciones de linfocitos T con perlas conjugadas con anticuerpos anti CD3/anti CD28, lo que indica que las perlas conjugadas con BCMA enriquecen los linfocitos T con CAR+ anti BCMA.

Tabla E1: Porcentaje de células EGFRt+ después de la incubación con perlas conjugadas con BCMA

Linfocitos T con CAR	Tipo de célula	Perlas conjugadas con anticuerpos	Porcentaje de células EGFRt+
Composición de linfocitos T con CAR anti BCMA n.º 1	CD4+	BCMA	76,6
		Anti CD3/CD28	63,5
	CD8+	BCMA	55,3
		Anti CD3/CD28	34,7
Composición de linfocitos T con CAR anti BCMA n.º 2	CD4+	BCMA	86,3
		Anti CD3/CD28	68,2
	CD8+	BCMA	58,3
		Anti CD3/CD28	39,9

Como se muestra en la figura 2A, en comparación con la incubación con perlas conjugadas con anticuerpos anti CD3/anti CD28, la incubación de la composición de linfocitos T que contenían linfocitos T que expresaban CAR anti BCMA con perlas conjugadas con BCMA durante cinco días dio como resultado una expresión reducida de CD25, pero una capacidad proliferativa algo mayor como lo demuestra una mayor disminución en la intensidad del colorante de proliferación CTV. La figura 2B proporciona un gráfico de histograma en el que el eje x muestra la intensidad de la tinción con CTV y el eje y muestra el número de células normalizadas para representar los datos en términos de "% de máximo", de acuerdo con el software FlowJo (designado "normalizado con respecto al modo"). El % del máximo indica la cantidad de células en cada rango de valores (los rangos numéricos del parámetro en el eje x) dividido por la cantidad de celdas en el rango de valores que contiene la mayor cantidad de células. FlowJo usa 256 rangos de valores y cada gráfico se escaló al porcentaje de su rango de valor máximo. Como se muestra, se observó una intensidad ligeramente reducida de la tinción con CTV (mayor dilución que evidencia la proliferación celular) en al menos un subconjunto de las células en comparación con los linfocitos T incubados con perlas conjugadas con anti CD3/anti CD28. Además, como se muestra en la figura 2C, la expresión de PD-1 aumentó en los linfocitos T CD4+ y CD8+ incubados con perlas conjugadas con anticuerpos anti CD3/anti CD28, mientras que la incubación de linfocitos T CD4+ y CD8+ con perlas conjugadas con BCMA no dio como resultado una mayor expresión de PD-1, particularmente en los linfocitos T CD8+.

Para evaluar más a fondo el grado de enriquecimiento de los linfocitos T con CAR+, se incubaron tres composiciones de linfocitos T separadas que comprendían linfocitos T procedentes de tres donantes diferentes genomanipulados para expresar un CAR anti BCMA con perlas conjugadas con BCMA. Las células se analizaron por citometría de flujo después de cuatro, siete o catorce días de incubación (las células se volvieron a sembrar en placas a los 7 días). Como se muestra en la figura 3A, el porcentaje de linfocitos T que expresaban CAR anti BCMA aumentó con el tiempo en las tres composiciones de linfocitos T. Las células CD8+ CAR+ de cada composición se analizaron por citometría de flujo para determinar la expresión superficial de CD25, CD27 o CCR7 después de cuatro, siete o catorce días de incubación. Como se muestra en la figura 3B, los niveles de expresión superficial de CD25 y CCR7 disminuyeron durante la incubación en comparación con las mediciones el día 4. Por el contrario, la expresión superficial de CD27 en las células CD8+ CAR+ se mantuvo relativamente constante.

Ejemplo 3: Efectos de las valoraciones de perlas conjugadas con BCMA en los linfocitos T con CAR

Se generó una composición de linfocitos T que contenía linfocitos T CD4/CD8 con CAR+ anti BCMA sustancialmente como se describe en el Ejemplo 2, excepto que la composición formulada resultante contenía aproximadamente un 74 % de células CD8+ y un 21 % de células CD4+, en la que el 82 % de las células totales fueron positivas para el CAR anti BCMA (según lo detectado usando el BCMA-FC soluble) y el 68 % fueron positivas para EGFRt según lo determinado usando un anticuerpo anti EGFR. La composición que contenía linfocitos T con CAR+ anti BCMA se congeló por crioconservación y se descongeló antes de su uso en los siguientes estudios.

Se añadieron diversas preparaciones de perlas conjugadas con BCMA (diámetro de 4,5 µm; incluyendo perlas de una composición de perlas conjugadas con BCMA de 50 µg/ml, 25 µg/ml, 10 µg/ml o 5 µg/ml), preparadas como se describe en el Ejemplo 1, en una relación de perlas:células de 1:1 con respecto a la composición celular que contenía linfocitos T que expresaban CAR anti BCMA y a continuación se incubaron durante 4 días. Los linfocitos T, que se habían marcado con el colorante marcador de proliferación CTV, se monitorizaron mediante citometría de flujo para

determinar la intensidad de la señal de CTV como indicador de la proliferación celular. Las células también se evaluaron para determinar la expresión superficial de CD3, CD4, CD8, CD25, PD1 y el marcador sustituto EGFRt mediante citometría de flujo.

La figura 4A muestra gráficos de barras de los niveles de tinción de CD25 superficial en células CD4+ y CD8+, y la figura 4B muestra gráficos de histograma, normalizados con respecto al modo como se ha descrito anteriormente, para determinar la expresión superficial de PD-1 en linfocitos T CD4+ o CD8+ después de la incubación con las concentraciones indicadas de perlas conjugadas con BCMA. Como se muestra en las figuras 4A y 4B, la incubación con perlas conjugadas con BCMA dio como resultado un aumento dependiente de la dosis en la expresión superficial de CD25 (paneles superiores) y PD-1 (paneles inferiores) tanto en células CD4+ como CD8+.

Como se muestra en la figura 5A y la figura 5B, no hubo diferencia dependiente de la dosis en los recuentos totales de linfocitos T evaluados por el número de células CD3+ (figura 5A), sin embargo, hubo una ligera disminución dependiente de la dosis en la intensidad fluorescente media (MFI) de CTV en células CD4+ (figura 5B) después de la incubación con perlas conjugadas con BCMA. Como se muestra en la figura 6, la incubación con perlas conjugadas con BCMA dio como resultado un aumento dependiente de la dosis en la expresión superficial de CD25 en células CD4+.

En conjunto, estos datos mostraron que las perlas conjugadas con BCMA con una concentración menor de BCMA demostraron una expresión de marcador de activación menor y una proliferación mayor. Estos datos indican que determinados atributos de una composición de linfocitos T que contiene linfocitos T con CAR+ anti BCMA se pueden manipular mediante la valoración de la cantidad de antígeno BCMA conjugado con las perlas.

Ejemplo 4: Evaluación de marcadores de linfocitos T en linfocitos T con CAR+ anti BCMA estimulados con perlas conjugadas con BCMA

Se incubaron perlas conjugadas con BCMA (diámetro de 4,5 µm) conjugadas con diversas cantidades de antígeno BCMA como se describe en el Ejemplo 1 con linfocitos T con CAR+ anti BCMA, y se evaluó la expresión de marcadores de linfocitos T.

En un experimento, los linfocitos T con CAR anti BCMA criopreservados, producidos sustancialmente como se describe en el Ejemplo 2 y formulados en una relación 1:1 de linfocitos T CD4+ y CD8+, se descongelaron y se sembraron a razón de $1,5 \times 10^6$ células por pocillo de una placa de 12 pocillos. Las células se incubaron durante tres días en presencia de perlas de una composición de perlas conjugadas con BCMA de 50 µg/ml, 100 µg/ml o 200 µg/ml. La incubación se realizó en una relación 1:1 de linfocitos T con respecto a perlas. El análisis de la expresión superficial de CD25 en células CD4+ y CD8+ por citometría de flujo mostró una inducción similar de CD25 para todas las concentraciones de perlas conjugadas con BCMA (figura 7A).

En otro experimento, aproximadamente $1,5 \times 10^6$ linfocitos T con CAR+, preparados como se ha descrito anteriormente, se añadieron a pocillos de una placa de 12 pocillos y se incubaron con perlas de una composición de perlas conjugadas con BCMA de 200 µg en una relación de linfocitos T con CAR+ con respecto a perlas conjugadas con BCMA de 1:0,3, 1:1 o 1:3 (aproximadamente $0,5 \times 10^6$, $1,5 \times 10^6$ y $4,5 \times 10^6$ perlas por pocillo, respectivamente). Como controles, 5 µg/ml de anticuerpo anti CD3 recubrieron los pocillos (concentración subóptima para la estimulación) o se sembraron células en ausencia de cualquier agente (sin control de estimulación). Cada condición se incubó en presencia o ausencia de lenalidomida 5 µM. Las células se incubaron durante cuatro días y a continuación se analizaron por citometría de flujo para determinar la expresión superficial de CD4, CD8, Tim3, PD-1, CD25 y CD69. La incubación de linfocitos T con CAR+ anti BCMA con perlas conjugadas con BCMA aumentó la expresión superficial de CD25 (figura 7B), CD69 (figura 7C) y Tim3 (figura 7D) en linfocitos T CD4+ y CD8+. Las células que se estimularon en presencia de la mayor cantidad de perlas proporcionadas en la relación de linfocitos T con CAR+ con respecto a perlas de 1:3 exhibieron el mayor aumento en la expresión de estos marcadores. Como se muestra en la figura 7E, la expresión superficial de PD-1 en linfocitos T con CAR+ anti BCMA también fue mayor cuando las células CD4+ se incubaron en una relación 1:3 de linfocitos T con CAR+ con respecto a perlas. También hubo un ligero aumento en la expresión superficial de PD-1 en células CD8+ cuando se estimularon con perlas conjugadas con BCMA a la concentración más alta de perlas de BCMA proporcionada en la relación 1:3 de linfocitos T CAR+ con respecto a perlas. Los resultados son consistentes con un hallazgo de que la concentración de BCMA presente durante la incubación puede modular diferencialmente la expresión del marcador de superficie en los linfocitos T con CAR+.

Como se muestra en la figura 7F, la presencia de lenalidomida 5 µM aumentó la capacidad proliferativa de los linfocitos T (observada por la disminución en la intensidad del colorante CTV) después de la incubación durante tres días con perlas conjugadas con 200 µg de antígeno BCMA en una relación 1:1 de linfocitos T con respecto a perlas en comparación con la incubación con las perlas en ausencia de lenalidomida (control del vehículo). Como se muestra en las figuras 7G y 7H, la presencia de lenalidomida durante la incubación aumentó aún más el grado de expresión superficial de CD25 en linfocitos T CD4+ y CD8+ inducidos después de la incubación de linfocitos T con CAR+ anti BCMA con perlas conjugadas con BCMA (figura 7G) o la estimulación anti CD3 (figura 7H).

En un experimento adicional, las composiciones de linfocitos T con CAR anti BCMA producidas sustancialmente como

se describe en el Ejemplo 1 se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 5×10^5 células por pocillo. Las composiciones de linfocitos T con CAR ensayadas contenían, en promedio, aproximadamente un 45 % de células con CAR+ anti BCMA en la siembra en placas. Las células de cada composición se incubaron durante 18 horas en presencia de perlas de una composición de perlas conjugadas con BCMA de 5 µg/ml, 50 µg/ml o 200 µg/ml en una relación 1:1 de linfocitos T con respecto a perlas. Como control, las células se incubaron con perlas conjugadas con anticuerpos anti CD3/anti CD28 (control positivo) o sin agente añadido (control negativo). Las incubaciones se realizaron en ausencia de lenalidomida o en presencia de lenalidomida 0,5 µM o 5 µM. Después de la incubación, las células se trataron con reactivos que permitieron la tinción extracelular e intracelular de anticuerpos mediante citometría de flujo para los factores de transcripción Blimp1, EOMES, GATA-3, Ikaros, Helios y Tbet y los marcadores CD25, CD31 y PD-1.

Se muestran los niveles de marcadores después de la incubación de una composición de linfocitos T con CAR+ de un donante de ejemplo para BLIMP-1 (figura 8A), CD25 (figura 8B), CD31 (figura 8C), PD-1 (figura 8D), Tbet (figura 8E) y EOMES (figura 8F), GATA-3 (figura 8G), Helios (figura 8H) e Ikaros (figura 8I). Como se muestra, la expresión de varios de los factores de transcripción asociados a linfocitos T efectores evaluados y los marcadores de activación aumentaron después de la estimulación con las perlas conjugadas con BCMA. Para muchos de los marcadores evaluados, el grado de expresión aumentada fue similar a la expresión inducida por la estimulación con perlas anti CD3/anti CD28. En algunos casos, el grado de estimulación con perlas conjugadas con BCMA fue mayor en presencia de 5 µg de perlas. Como se muestra en la figura 8I, el nivel de expresión de Ikaros disminuyó en presencia de lenalidomida en todas las condiciones. Se observaron resultados similares a partir de una composición de linfocitos T con CAR+ generada a partir de un segundo donante, excepto que no se observó ningún cambio en la expresión de Helios a partir de células de este donante cuando se estimularon en las condiciones ensayadas.

Ejemplo 5: Evaluación de la actividad de los linfocitos T con CAR anti BCMA estimulados con perlas conjugadas con BCMA

Se evaluó la actividad de los linfocitos T con CAR anti BCMA que se generaron a partir de un proceso que incluía la expansión en presencia de perlas conjugadas con BCMA.

A. Respuestas efectoras

Los linfocitos T con CAR anti BCMA criocongelados, producidos sustancialmente como se describe en el Ejemplo 2 y formulados en una relación 1:1 de linfocitos T CD4+ y CD8+, se descongelaron. A menos que se indique lo contrario, se añadieron perlas (diámetro de aproximadamente 4,5 µm) de una composición de perlas conjugadas con BCMA de 5 µg/ml o 50 µg/ml, generada como se describe en el Ejemplo 1, a los pocillos en una relación de linfocitos T con respecto a perlas de 1:2 en presencia o ausencia de lenalidomida 5 µM. Las células se incubaron hasta 14 días y se analizaron en diversos puntos temporales para determinar la secreción de citocinas, la expansión celular por citometría de flujo para el marcador sustituto EGFRt y para determinar la actividad citolítica.

a. Expresión de citocinas

(i) Presencia de citocinas en el sobrenadante

Veinticuatro horas después de la adición de perlas conjugadas con BCMA, se evaluó la presencia de TNF-α, IFNγ e IL-2 en los sobrenadantes de cultivo. Como se muestra en las figuras 9A-9C, la incubación con perlas conjugadas con BCMA indujo la secreción de IFNγ (figura 9A), IL-2 (figura 9B) y TNF-α (figura 9C) en sobrenadantes de cultivo. El grado de producción de citocinas fue mayor cuando las células se incubaron con perlas de la composición de perlas conjugadas con BCMA de 50 µg/ml en comparación con la composición de perlas conjugadas con BCMA de 5 µg/ml, lo que demuestra que la estimulación con CAR a través de perlas de BCMA dependía de la dosis. Como se muestra, la lenalidomida aumentó la producción de citocinas de linfocitos T con CAR+ inducida por BCMA después de la estimulación con las perlas conjugadas con BCMA.

En un estudio de ejemplo adicional, se generaron dos composiciones de linfocitos T con CAR anti BCMA diferentes a partir de diferentes donantes, cada una de las cuales contenía linfocitos T que expresaban el mismo CAR anti BCMA. Las células se descongelaron y se incubaron con perlas (diámetro de aproximadamente 4,5 µm) de una composición de perlas conjugadas con BCMA de 5 µg/ml o 200 µg/ml generada como se describe en el Ejemplo 1. La incubación se realizó en una relación de linfocitos T con respecto a perlas de 1:1 en presencia o ausencia de lenalidomida 1 µM o 5 µM. Veinticuatro horas después de la adición de perlas conjugadas con BCMA, se evaluó la producción de IL-2 por los linfocitos T con CAR+ anti BCMA en los sobrenadantes de cultivo. Como se muestra en la figura 9D, se observó una mayor producción de IL-2 en presencia de una alta estimulación antigénica (perlas conjugadas con BCMA de 200 µg/ml) en comparación con una menor estimulación antigénica (perlas conjugadas con BCMA de 5 µg/ml). La lenalidomida, a 1 µM o 5 µM, aumentó la producción de citocinas en presencia de estimulación antigénica alta y baja.

(ii) Niveles intracelulares de citocinas

Los linfocitos T con CAR+ anti BCMA se incubaron en presencia de lenalidomida 1 µM o un vehículo y 50 µg/ml de

perlas conjugadas con BCMA-Fc durante 2 horas, y las células se evaluaron mediante citometría de flujo para determinar STAT 5 fosforilado. Para evaluar los niveles de citocinas IFN γ y TNF α , los linfocitos T con CAR+ anti BCMA se incubaron en presencia de lenalidomida 0,1 μ M o 1 μ M o un vehículo y 5 μ g/ml, 50 μ g/ml o 200 μ g/ml de perlas conjugadas con BCMA-Fc durante 24 horas. Las células se seleccionaron en células CD3+ vivas transducidas y se evaluaron mediante citometría de flujo para determinar la acumulación intracelular de citocinas de IFN γ y TNF α en células CD4+ y CD8+.

Como se muestra en la figura 9E, una estimulación de 2 horas con antígeno aumentó el porcentaje de células positivas para phosphor-STATS en comparación con el control sin estimulación (mostrado con la línea discontinua). Los resultados de los niveles intracelulares de citocinas de IFN γ y TNF α de linfocitos T con CAR anti BCMA generados a partir de un donante de linfocitos T con CAR normal representativo se muestran en la figura 9F. En este estudio, la producción de citocinas de linfocitos T con CAR anti BCMA aumentó con lenalidomida en un amplio intervalo de concentraciones y niveles de antígeno.

b. Proliferación celular

El recuento total de células, monitorizado el día 4 (figura 9G) y el día 7 (figura 9H), aumentó después de la estimulación de linfocitos T con CAR+ anti BCMA con perlas de una composición de perlas conjugadas con BCMA de 50 μ g/ml, pero no de una composición de perlas conjugadas con BCMA de 5 μ g/ml, en comparación con las células presentes en el momento del inicio de la incubación (línea discontinua). Se observó un pequeño aumento en la proliferación en células incubadas con 50 μ g/ml de perlas en presencia de lenalidomida el día 7.

Para evaluar más a fondo la proliferación, las células que contenían linfocitos T que expresaban CAR anti BCMA se marcaron con el colorante marcador de proliferación CELLTRACE VIOLET (CTV; ThermoFisher Scientific, Waltham MA) de acuerdo con el protocolo del fabricante antes de la incubación con las perlas conjugadas con BCMA. La proliferación se evaluó mediante dilución de colorante usando citometría de flujo en células que se estimularon con perlas de la composición de perlas conjugadas con BCMA de 50 μ g/ml. En comparación con la proliferación en ausencia de lenalidomida, hubo un ligero retraso en la proliferación según se evaluó mediante dilución de CTV en presencia de lenalidomida el día 4, pero no el día 7 (figura 9I).

c. Expansión

Cuatro días y siete días después de la adición de perlas conjugadas con BCMA, las células incubadas se tiñeron con CD4 o CD8 y con un anticuerpo anti EGFR para determinar el porcentaje de células positivas para EGFRt como sustituto de los linfocitos T con CAR+. En el momento de la siembra en placas, el 26 % de las células CD4+ expresaron CAR anti BCMA y el 39 % de las células CD8+ expresaron CAR anti BCMA, según se determinó mediante tinción con BCMA-Fc. El porcentaje de linfocitos T EGFRt+CD4+ aumentó de aproximadamente el 26 % al inicio de la incubación a más del 40 % el día 4 (figura 9J) y más del 60 % el día 7 (figura 9K) cuando las células se incubaron en presencia de perlas de una composición de perlas conjugadas con BCMA de 50 μ g/ml. Como se muestra en la figura 9K, el porcentaje de linfocitos T EGFRt+CD8+ aumentó el día 7 de aproximadamente el 38 % al inicio de la incubación a más del 60 % cuando las células se incubaron en presencia de perlas de la composición de perlas conjugadas con BCMA de 50 μ g/ml. El grado de expansión celular fue mayor cuando las células se incubaron en presencia de perlas de una composición de perlas conjugadas con BCMA de 50 μ g/ml en comparación con perlas de la composición de perlas conjugadas con BCMA de 5 μ g/ml. La presencia de lenalidomida no afectó sustancialmente al grado de expansión de los linfocitos T con CAR+ en este estudio.

d. Actividad citolítica

La actividad citolítica de los linfocitos T con CAR+ después de la incubación con perlas conjugadas con BCMA se evaluó mediante la incubación con la estirpe celular diana que expresaba BCMA RPMI-8226, que es una estirpe celular de mieloma múltiple BCMA+. Después de siete días de incubación de linfocitos T con CAR+ anti BCMA con perlas conjugadas con BCMA (5 μ g/ml o 50 μ g/ml) en presencia o ausencia de lenalidomida, las perlas se retiraron de los cultivos y las células se sembraron en placas con las células diana RPMI-8226 en una relación de células efectoras con respecto a células diana de 3:1 o 1:1 en presencia o ausencia adicional de lenalidomida 5 μ M. Para realizar el ensayo citolítico, las células diana RPMI-8226 se marcaron con NucLight Red (NLR) para permitir el seguimiento de las células diana mediante microscopía. La actividad citolítica se evaluó midiendo la pérdida de células diana viables durante un período de cuatro días, según lo determinado por la señal roja fluorescente (usando el sistema de análisis de células vivas INCUCYTE®, Essen Bioscience). La cantidad de células viables se normalizó con respecto a las células del día 0 antes de la incubación con las células diana RPMI-8226.

En la figura 9L se muestran los resultados de ejemplo en la relación de células efectoras con respecto a células diana de 1:1. Como se muestra, los linfocitos T con CAR+ anti BCMA demostraron una destrucción eficaz en el ensayo. Los linfocitos T con CAR+ anti BCMA que se estimularon con perlas de la composición de perlas conjugadas con BCMA de 5 μ g/ml fueron ligeramente menos eficientes en la destrucción celular que los linfocitos T con CAR+ anti BCMA que se estimularon con perlas de la composición de perlas conjugadas con BCMA de 5 μ g/ml. Para todas las condiciones, la preincubación con lenalidomida durante los siete días de incubación previos al ensayo de destrucción aumentó la

actividad citolítica de los linfocitos T con CAR+. La presencia de lenalidomida durante el ensayo de destrucción celular no afectó sustancialmente a la actividad de destrucción. No se observó destrucción celular cuando las células RPMI 8226 se cultivaron solas o en presencia de lenalidomida, lo que demuestra que la lenalidomida no influyó directamente en la viabilidad de las células diana en este ensayo.

En un estudio de ejemplo adicional, los linfocitos T con CAR+ anti BCMA no se trataron, o se incubaron durante 24 horas o durante siete días con perlas (diámetro de aproximadamente 4,5 µm) de una composición de perlas conjugadas con BCMA de 50 µg/ml generada como se describe en el Ejemplo 1 en una relación de perlas con respecto a células de 1:1. Los linfocitos T con CAR+ anti BCMA se retiraron de los cultivos y se incubaron con células diana RPMI-8226 en una relación de células efectoras con respecto a células diana de 0,3:1 o 1:1. Para evaluar la respuesta de las citocinas a las células diana después de la incubación con perlas conjugadas con BCMA, se midieron los niveles de IFN gamma en el sobrenadante. Como se muestra en la figura 9M, los linfocitos T con CAR+ anti BCMA que se incubaron durante 24 horas con las perlas conjugadas con BCMA produjeron mayor IFN-gamma en comparación con las otras células ensayadas cuando se cultivaron con células diana RPMI-8226 en cualquier relación. Como se muestra en la figura 9N para la relación de efector con respecto a célula diana de 1:1, los linfocitos T anti BCMA CAR demostraron una destrucción eficaz después de la incubación con perlas conjugadas con BCMA durante 24 horas o 7 días, lo que demuestra que las células conservaron la función después de la estimulación con las perlas.

B. Reestimulación en serie

Se generaron composiciones de linfocitos T anti BCMA CAR a partir de tres donantes diferentes, cada una de los cuales contenía linfocitos T que expresaban el mismo CAR anti BCMA, se descongelaron y se incubaron durante siete días con perlas (diámetro de aproximadamente 4,5 µm) de una composición de perlas conjugadas con BCMA de 50 µg/ml generada como se ha descrito en el Ejemplo 1 en una relación 1:1 de perlas con respecto células. La incubación se realizó en presencia de lenalidomida 5 µM o en ausencia de lenalidomida (control de vehículo). Las células se recogieron después de 7 días y se volvieron a sembrar en placas durante tres rondas más hasta 28 días, y cada ronda implicó restablecer la densidad de siembra inicial e incubación durante 7 días más en presencia de la misma concentración de lenalidomida.

En cada reinicio después del pretratamiento, se evaluó la actividad citolítica mediante incubación con la estirpe celular diana que expresaba BCMA RPMI-8226 (marcada con NucLight Red (NLR)) en una relación de efector con respecto a célula diana (E:D) de 1:1 en presencia o ausencia adicional de lenalidomida. La actividad citolítica se evaluó midiendo la pérdida de células diana viables durante un período de hasta 80-150 horas, según lo determinado por la señal roja fluorescente (usando el sistema de análisis de células vivas IncuCyte®, Essen Bioscience). Las células de cada condición se sembraron en placas por triplicado. Se determinó el % de destrucción celular en comparación con el control de solo vehículo (establecido en 100 %).

La figura 10A muestra los resultados de la actividad citolítica de los linfocitos T con CAR+ anti BCMA de un donante de ejemplo después del pretratamiento durante 7 días, 14 días o 21 días. Como se muestra, los linfocitos T con CAR+ anti BCMA que se preincubaron con lenalidomida durante 7 días o 14 días exhibieron una mayor actividad citolítica en comparación con las células que no se preincubaron en presencia de lenalidomida. En este donante, se observó una disminución general en la eficacia de la destrucción por parte de los linfocitos T con CAR+ anti BCMA que se preincubaron con lenalidomida durante 14 o 21 días en comparación con el día 7. Se observaron efectos similares en la actividad citolítica de los linfocitos T con CAR+ anti BCMA después del pretratamiento con lenalidomida durante 7 o 14 días en el donante; la actividad citolítica después de 21 días de pretratamiento con lenalidomida no se evaluó en este donante. Como se muestra en la figura 10B, se observó una mayor eficacia de destrucción de linfocitos T con CAR+ anti BCMA en este donante en células que se preincubaron con lenalidomida en todos los puntos temporales.

Ejemplo 6: Transducción y expansión de linfocitos T con CAR+ anti BCMA en presencia de perlas conjugadas con BCMA

Se obtuvieron muestras de leucocitaféresis humana enriquecidas con células mononucleares a partir de una muestra de sangre completa de un sujeto usando un sistema de recogida de leucocitaféresis. El mismo día de la leucocitaféresis, las células de la muestra de leucocitaféresis se lavaron y se suspendieron de nuevo en un tampón para su uso en la selección basada en afinidad, conteniendo el tampón una solución salina tamponada con fosfato (PBS), EDTA y serralbúmina humana. Para la selección de linfocitos T basada en inmunoafinidad, las células lavadas en el tampón de selección se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con perlas magnéticas acopladas a anticuerpos monoclonales específicos para CD4 y CD8, y se enriquecieron mediante selección positiva usando una columna de separación magnética. Las células CD4+ y CD8+ enriquecidas, en una relación de 1:1, se suspendieron de nuevo en medios de crioconservación y las células se crioconservaron en un congelador de velocidad controlada y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso posterior. Se usaron células crioconservadas de 4 donantes diferentes.

Los linfocitos T CD4+ y CD8+ crioconservados se descongelaron, se lavaron y a continuación se pusieron en contacto con partículas de vector lentivírico sin activación previa de las células con un agente de activación de linfocitos T, por ejemplo, sin incubar las células con anti CD3/anti CD28. Para la transducción, se añadieron aproximadamente 1×10^6

de los linfocitos T descongelados a pocillos individuales de una placa de 96 pocillos. Las partículas de vector lentivírico, que se habían mezclado previamente con un adyuvante de transducción de poliacrilato (en este caso, 100 µg/ml de sulfato de protamina) se añadieron a los pocillos. Las partículas de vector lentivírico contenían un ácido nucleico que codificaba un transgén que codificaba un CAR anti BCMA y una secuencia EGFR truncada (EGFRt) para su uso como

5 marcador de transducción, separada de la secuencia CAR por una secuencia T2A autoescindible. El volumen final por pocillo se ajustó a 100 µl. Se prepararon cinco composiciones diferentes que contenían células genomanipuladas para expresar CAR anti BCMA usando los procedimientos descritos anteriormente.

10 Se prepararon perlas conjugadas con BCMA-Fc y anti CD28 (denominadas perlas conjugadas con BCMA/anti CD28) sustancialmente como se ha descrito en el Ejemplo 1. Inmediatamente después de la transducción, se añadieron aproximadamente 50 µl de las células generadas a partir de cada donante a 500 µl de medio que contenía perlas conjugadas con BCMA/anti CD28 o perlas conjugadas con anti CD3/anti CD28 en una relación de perlas de 1:1 por célula y se incubaron durante 12 días.

15 Las células se contaron cada dos días y se tiñeron para determinar la expresión de EGFRt (un marcador sustituto de la expresión de CAR) usando un anticuerpo anti EGFR los días 3, 7, 10 y 12 posteriores a la transfección. Los datos mostraron que las composiciones de linfocitos T incubadas durante hasta 12 días en presencia de las perlas conjugadas con anti CD3/anti CD28 se expandieron en el cultivo con una expansión de entre aproximadamente 95 veces y 140 veces que se produjo el día 12 de cultivo. La expansión de los linfocitos T simulados de control que no

20 fueron transducidos, pero se incubaron con las perlas conjugadas con anti CD3/anti CD28, también exhibieron una expansión de aproximadamente 65 veces el día 12 en comparación con el inicio de la incubación. El factor de expansión de las composiciones de linfocitos T que se incubaron con perlas BCMA/anti CD28 inmediatamente después de la transducción fue de aproximadamente 1,0 veces a 7,0 veces el día 12.

25 Como se muestra en la figura 11, las composiciones de linfocitos T que se incubaron en presencia de anti CD3/anti CD28 exhibieron una alta expresión del marcador de transducción EGFRt, incluso sin activación de las células antes de la transducción con las partículas víricas. Este resultado es consistente con la estimulación inmediata que se asocia con la expresión superficial de CAR. Los linfocitos T estimulados con perlas BCMA/anti CD28 exhibieron una cinética más prolongada para lograr el mismo porcentaje de células positivas para EGFRt, aunque para el día 12 entre

30 aproximadamente el 60 % y el 90 % de las células fueron positivas para EGFRt. Los resultados indican que, a pesar del crecimiento más lento de las células después de la incubación con perlas BCMA/anti CD28 en comparación con las perlas anti CD3/anti CD28, los linfocitos T con CAR+ pudieron enriquecerse durante los 12 días de cultivo, lo que indica que las perlas BCMA/anti CD28 expandieron los linfocitos T con CAR+.

35 Los linfocitos T incubados en las condiciones descritas anteriormente, sin activación de las células antes de la transducción con partículas de vector lentivírico, también se tiñeron el día 12 para determinar la expresión superficial de CD4 y CD8 y se analizaron por citometría de flujo. Como control, una composición de linfocitos T generada a partir de células de un donante, también en una relación de 1:1 de células CD4+ y CD8+, se activó antes de la transducción mediante estimulación con perlas anti CD3/anti CD28 durante 24 horas antes de poner en contacto las células

40 activadas con partículas de vector lentivírico que expresaban un CAR anti BCMA como se ha descrito anteriormente; en esta condición, las células se incubaron durante 12 días más, pero en ausencia de perlas conjugadas.

La Tabla E2 resume los resultados de las mismas células de donante incubadas en las condiciones anteriores. Como se muestra, la incubación de células con perlas conjugadas con anti CD3/anti CD28 o perlas BCMA/anti CD28, sin

45 activación de las células antes de la transducción, alteró la relación de linfocitos T CD4/CD8 en comparación con las células que se activaron por primera vez 24 horas en presencia de perlas conjugadas con anti CD3/anti CD28 antes de la transducción. Además, estos resultados mostraron que la incubación con las perlas conjugadas con anticuerpo anti CD28 o las perlas conjugadas con anticuerpo anti CD3/anti CD28, sin activación previa de los linfocitos T, dio como resultado niveles de expresión de CAR y fenotipo de células CD4/CD8 similares. Como se muestra en la Tabla E3, se observó una inversión similar de la relación de linfocitos T CD4/CD8 en linfocitos T procedentes de 4 donantes diferentes cuando se incubaron con perlas anti CD3/anti CD28, sin activación de las células antes de la transducción, en comparación con las células que se activaron por primera vez durante 24 horas en presencia de perlas conjugadas con anti CD3/anti CD28 antes de la transducción.

55 **Tabla E2: Porcentaje de células CD4+ y CD8+ en cultivos de linfocitos T que se trataron con perlas conjugadas con antígeno y/o anticuerpo.**

Tratamiento de perlas	% de células CD4+	% de células CD8+
BCMA/anti CD28	92,2	7,57
Anti CD3/Anti CD28	76,7	23,0
Anti CD3/Anti CD28 (24 h)	19,9	78,5

Tabla E3: Porcentaje de células CD4+ y CD8+ en cultivos de linfocitos T que se trataron con perlas conjugadas con antígeno.

Donante	Tratamiento de perlas	% de células CD4+	% de células CD8+
1	Anti CD3/Anti CD28	65,6	29,7
2	Anti CD3/Anti CD28	68,0	27,8
3	Anti CD3/Anti CD28	61,8	32,6
4	Anti CD3/Anti CD28	76,8	21,9
4	Anti CD3/Anti CD28 (24 h)	19,9	76,8

Ejemplo 7: Generación de perlas conjugadas con ROR1

El receptor 1 huérfano similar a tirosina cinasa receptora (ROR1) se conjugó con perlas mediante el acoplamiento covalente de un polipéptido de fusión ROR1-Fc, que contenía el dominio extracelular de ROR1 humano fusionado en su extremo C a una región Fc de IgG, a la superficie de perlas magnéticas activadas con tosilo disponibles comercialmente (ThermoFisher, Waltham MA). Las perlas eran perlas activadas con tosilo, monodispersas, no porosas y superparamagnéticas que se unen covalentemente a grupos amino primario y sulfhidrilo. La conjugación se realizó usando perlas que tenían un diámetro de aproximadamente 2,8 μm (designadas M-280) o 4,5 μm (designadas M-450).

ROR1-Fc contenía un fragmento de ROR1 humano y un Fc de IgG1 humana conectado con un enlazador de la siguiente manera:

QETELSVSAELVPTSSWNISSELNKDSYLTLDPEMNNITTSLGQTAELHCKVS
GNPPPTIRWFKNDAPVVQEPRRLSFRSTIYGSRLRIRNLDTTDTGYFQCVATNGKEVVSS
TGVLVFKFGPPPTASPGYSDEYEEDGFCQPYRGIACARFIGNRTVYMESLHMQGEIENQI
TAAFTMIGTSSHLSDKCSQFAIPSLCHYAFPYCDETSSVPKPRDLRDECEILENVLCQTE
YIFARSNPMILMRLKLPNCEDLPQPESPEAANCIRIGIPMADPINKNHKCYNSTGVDRG
TVSVTKSGRQCQPWNSQYPHTHTFTALRFPELNGGHSYCRNPGNQKEAPWCFTLDENF
KSDLCDIPACDSKDSKEKNKMEILYGGGGSPKSSDKTHTCPPCAPEAEAGAPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 33).

Se añadieron diversas concentraciones de la proteína de fusión ROR1-Fc a aproximadamente 1 ml de perlas activadas por tosilo (por ejemplo, 4×10^9 perlas activadas por tosilo con un diámetro de 2,8 μm). El acoplamiento covalente se realizó mediante incubación durante una noche a 37 °C en una solución tamponada con fosfato (PBS) que contenía seroalbúmina humana (HSA) al 0,1 %. Las perlas se lavaron y se suspendieron de nuevo en 1 ml de PBS con HSA al 0,1 %. Tras la conjugación, la concentración de perlas se determinó usando un celómetro.

Los linfocitos T que expresan CAR anti ROR1 se estimulan mediante incubación con perlas conjugadas con ROR1-Fc.

Ejemplo 8: Generación de perlas conjugadas con CD22

CD22 se conjugó con perlas mediante el acoplamiento covalente de un polipéptido de fusión CD22-Fc, que contenía el dominio extracelular de CD22 humano fusionado en su extremo C a una región Fc de IgG, a la superficie de perlas magnéticas activadas con tosilo disponibles comercialmente (ThermoFisher, Waltham MA). Las perlas eran perlas activadas con tosilo, monodispersas, no porosas y superparamagnéticas que se unen covalentemente a grupos amino primario y sulfhidrilo. La conjugación se realizó usando perlas que tenían un diámetro de aproximadamente 2,8 μm (designadas M-280) o 4,5 μm (designadas M-450).

CD22-Fc contenía el dominio extracelular de CD22 humano y un Fc de IgG1 humana conectado con un enlazador de la siguiente manera:

DSSKWVFEHPETLYAWEGACVWIPCTYRALDGDLESFILFHNPEYNKNTSKFDGTRL YE
 STKDGVKVPSEQKRVQFLGDKNKNTLSIHPVHLNDSGQLGLRMESKTEKWMERIHLNV
 SERPFPPHIQLPPEIQESQEVTLTCLLNFSYGYPIQLQWLLEGVPMRQAAVTSTSLTIKS
 VFTRSELKFSPQWSSHGKIVTCQLQDADGKFLSNDTVQLNVKHTPKLEIKVTPSDAIVR
 EGDSVTMTCEVSSSNPEYTTVSWLKDGTSLKKQNTFTLNLREVTKDQSGKYCCQVSND
 VGPGRSEEVFLQVQYAPEPSTVQILHSPAVEGSQVEFLCMSLANPLPTNYTWYHNGKE
 MQGRTEEKVHIPKILPWHAGTYSYCAENILGTGQRGPGAELDVQYPPKKVTTVIQNPMP
 IREGDTVTLSCNYNSSNPSVTRYEWKPHGAWEPSLGVLEKIQNVGWDNTTIACAACNS
 WCSWASPVALNVQYAPRDVVRVKIKPLSEIHSNSVSLQCDFFSSHPKEVQFFWEKNG
 RLLGKESQLNFDSSPEDAGSYSCWVNNSIGQTASKAWTLEVLYAPRRLRVSMSPGDQV
 MEGKSATLTCESDANPPVSHYTWFWDWNNQSLPYHSQKLRLPEVKVQHSGAYWCQGTN
 SVGKGRSPLSTLTVYYSPEITIGRRGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPK
 DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
 LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
 FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 34).

Se añadieron diversas concentraciones de la proteína de fusión CD22-Fc a aproximadamente 1 ml de perlas activadas por tosilo (por ejemplo, 4×10^9 perlas activadas por tosilo con un diámetro de 2,8 μm). El acoplamiento covalente se realizó mediante incubación durante una noche a 37 °C en una solución tamponada con fosfato (PBS). Las perlas se lavaron y se suspendieron de nuevo en 1 ml de PBS con HSA al 0,1 %. Tras la conjugación, la concentración de perlas se determinó usando un celómetro.

Los linfocitos T que expresan CAR anti CD22 se estimulan mediante incubación con perlas conjugadas con CD22-Fc.

Ejemplo 9: Conjugación de anticuerpo antiidiotipo contra perlas

Uno de dos diferentes el anticuerpo antiidiotipo (ID) anti CD19 y el anticuerpo anti ID específico de scFv procedente de FMC63 (secuencias expuestas en la Tabla E4) se acopló covalentemente a la superficie de perlas magnéticas activadas con tosilo disponibles comercialmente (ThermoFisher, Waltham MA) que son perlas activadas con tosilo monodispersas, no porosas y superparamagnéticas. Las perlas se unen covalentemente a grupos amino primario y sulfhidrilo. La conjugación se realizó usando perlas que tenían un diámetro de aproximadamente 2,8 μm (designadas M-280) o 4,5 μm (designadas M-450).

Tabla E4. Secuencias anti ID B-1 y B-2

	Cadena ligera			Cadena pesada		
	Completa (SEQ ID NO)	Variable (SEQ ID NO)	Constante (SEQ ID NO)	Completa (SEQ ID NO)	Variable (SEQ ID NO)	Constante (SEQ ID NO)
Aminoácido anti ID B-1	125	98	124	122	73	121
Aminoácido anti ID B-2	131	99	124	128	74	127

Se añadieron 200 μg de anticuerpo anti ID a aproximadamente 1 ml de las perlas activadas con tosilo (por ejemplo, aproximadamente 4×10^9 perlas activadas con tosilo con un diámetro de 2,8 μm o aproximadamente 4×10^8 perlas activadas con tosilo con un diámetro de 4,5 μm) y se realizó un acoplamiento covalente mediante incubación durante una noche a 37 °C en una solución tamponada con fosfato (PBS) que contenía seroalbúmina humana (HSA) al 0,1 %. Las perlas se lavaron y se suspendieron de nuevo en 1 ml de PBS con HSA al 0,1 %. Tras la conjugación, la concentración de perlas se determinó usando un celómetro.

Para evaluar la estabilidad de las perlas conjugadas con anti ID, las perlas se granularon, el sobrenadante se eliminó y se cargó en un gel SDS-PAGE Bis-Tris al 4-12 % y el gel se tiñó con azul de Coomassie. Como control de la proteína total conjugada en las perlas, las perlas granuladas se hirvieron en un tampón de muestra LDS 4x (dodecil sulfato de litio) a aproximadamente 70 °C durante 20 minutos y también se analizaron aproximadamente 12,5 μl o 25 μl de

sobrenadante hervido en gel SDS-PAGE y se evaluaron con azul de Coomassie. También se evaluaron aproximadamente 2,5 µg o 5,0 µg de anticuerpo anti ID que no se había conjugado con las perlas (control positivo) o 5 µl de HSA al 0,1 % (control negativo) mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. No se detectó ningún anticuerpo anti ID en el sobrenadante de las muestras conjugadas que no habían sido hervidas, lo que indica que la conjugación era estable, mientras que el anticuerpo anti ID se detectó en el sobrenadante de las muestras conjugadas que se llevaron a ebullición.

Ejemplo 10: Evaluación de la estimulación de linfocitos T cultivados con perlas conjugadas con anticuerpos antiidiotipo

Las perlas conjugadas con anti ID B-1 específicos de scFv procedente de FMC63 se incubaron con linfocitos T. Los linfocitos T purificados con CD3 se aislaron mediante enriquecimiento basado en inmunoafinidad a partir de muestras de leucocitaféresis de donantes sanos. Las células aisladas fueron transducidas con un vector vírico que codificaba un CAR anti CD19 que tenía un scFv procedente de FMC63. La construcción del vector vírico codificó además un EGFR truncado (EGFRt), que sirvió como marcador sustituto de la expresión de CAR; la región codificante de EGFRt se separó de la secuencia de CAR mediante una secuencia de salto T2A. Después de las transducciones, las células se expandieron en cultivo y se congelaron mediante crioconservación.

Para estudios de estimulación de linfocitos T, las células que expresaban CAR CD4+ o CD8+ descongeladas se sembraron por separado a razón de un total de aproximadamente 50.000 células por pocillo. En algunos casos, el medio de cultivo se complementó adicionalmente con citocinas de la siguiente manera: Para las células CD4+, aproximadamente 1200 UI/ml de IL-7 recombinante, 20 UI/ml de IL-15 recombinante y 100 UI/ml de IL-2 recombinante; para las células CD8+, aproximadamente 200 UI/ml de IL-2 recombinante y 20 UI/ml de IL-15 recombinante. Se añadieron perlas conjugadas con anti ID B-1 a las células en una relación de célula:perla de 1:1 o 1:5 y se incubaron hasta 14 días con un intercambio de medio del 50 % cada 2-3 días. Como control positivo, las células se cultivaron con perlas magnéticas anti CD3/anti CD28 en una relación de célula:perla de 3:1 en presencia o ausencia de las citocinas indicadas.

En diversos momentos del cultivo, se evaluaron las células transducidas CD4+ o CD8+ (según lo detectado mediante anti EGFR para determinar la expresión del marcador sustituto) para determinar su expansión, expresión de PD-1 y viabilidad.

Como se muestra en las figuras 12A y 12B, la expansión de linfocitos T CD4+ y CD8+, respectivamente, se observó cuando las células se cultivaron con perlas conjugadas con anti ID en una relación de célula:perla de 1:1 o 1:5, particularmente en presencia de citocinas. El grado de expansión fue mayor que cuando las células se cultivaron con las perlas magnéticas anti CD3/anti CD28 de control.

La expresión superficial de PD-1 en el subconjunto de células CD4+ se evaluó mediante citometría de flujo los días 3, 7, 10 y 14 de cultivo. Como se muestra en la figura 13, la expresión de PD-1 fue alta en células cultivadas con perlas magnéticas anti CD3/anti CD28, sin embargo, los niveles de PD-1 fueron sustancialmente más bajos o indetectables en las células que se cultivaron con perlas conjugadas con anti ID.

Como se muestra en la figura 14, el porcentaje de viabilidad de los linfocitos T CD4+ y CD8+ cultivados con una relación de 1:1 o 1:5 de perlas conjugadas con anti ID o las perlas conjugadas con anti CD3/anti CD28 de control se mantuvo constantemente alto durante el período de cultivo cuando las células se cultivaron adicionalmente en presencia de citocinas. En todas las condiciones, sin embargo, la viabilidad de las células disminuyó en ausencia de citocinas añadidas, teniendo lugar la mayor pérdida de viabilidad celular en los últimos días del cultivo celular.

Ejemplo 11: Evaluación de la producción de citocinas de linfocitos T cultivados con perlas conjugadas con anticuerpos antiidiotipo

Los linfocitos T genomanipulados con un CAR anti CD19 que tiene un scFv procedente de FMC63 se generaron sustancialmente como se ha descrito en el Ejemplo 10. Los linfocitos T CD8+ descongelados se cultivaron con perlas conjugadas con anti ID B-1 durante 4 horas en presencia de un inhibidor de Golgi. Los niveles intracelulares de citocinas de TNFα, IFNγ e IL-2 se determinaron por citometría de flujo en el subconjunto de linfocitos T con CAR+ (como se determinó por tinción de superficie positiva con anti EGFR para el marcador sustituto) o el subconjunto de linfocitos T con CAR- (como se determinó por tinción de superficie negativa con anti EGFR). Como comparación, los linfocitos T con CAR+ (EGFRt+) también se cultivaron con células diana que expresaban CD19 (células K562 transducidas para expresar CD19, K562-CD19) en una relación efector:linfocito T de 1:2.

Como se muestra en la figura 15A, los niveles intracelulares de citocinas de TNFα, IFNγ e IL2 se indujeron en linfocitos T con CAR+ (EGFRt+), pero no en linfocitos T con CAR- (EGFRt-), cuando las células se cultivaron en presencia de perlas conjugadas con anti ID B-1. En este estudio, el grado de estimulación observado en presencia de perlas conjugadas con anti ID fue similar a la estimulación de linfocitos T con CAR+ usando células K562-CD19 que expresaban antígeno, que es un reactivo de estimulación específico de CAR alternativo (figura 15B). Estos resultados demostraron que los anti ID conjugados en las perlas son agonistas y estimulan específicamente los linfocitos T que

expresan un CAR que tiene un dominio de unión a antígeno reconocido por el anticuerpo anti ID. Además, el reactivo de perlas proporciona un mejor reactivo de estimulación específico de CAR en comparación con las estirpes celulares, que requieren cultivo celular y son propensas a la variabilidad de lote a lote.

5 **Ejemplo 12: Evaluación de la expansión después de la reestimulación en serie**

La capacidad de las células para expandirse *ex vivo* tras varias estimulaciones puede ser un sustituto potencial de la capacidad de los linfocitos T con CAR+ para persistir (por ejemplo, después de la activación inicial) y/o es indicativo de la función *in vivo* (Zhao *et al.* (2015) Cancer Cell, 28:415-28). Los linfocitos T con CAR+ se generaron como se ha descrito anteriormente y los linfocitos T que expresaban CAR CD4+ o CD8+ descongelados se sembraron en placas por separado a razón de 50.000 células con CAR+/pocillo. Se añadieron perlas conjugadas con anti ID B-1 a las células en una relación de célula:perla de 1:1 o 1:5 en presencia o ausencia de citocinas como se ha descrito en el Ejemplo 10. Como control, se añadieron perlas magnéticas anti CD3/anti CD28 a las células en una relación de célula:perla de 3:1 en presencia o ausencia de citocinas. Las células se recogieron cada 3-4 días y se contaron, y se volvieron a estimular con nuevas células diana usando las mismas condiciones de cultivo después de restablecer el número de células a la densidad de siembra inicial para cada ronda. Se realizaron un total de 4 rondas de estimulación durante un período de cultivo de 14 días. Para cada ronda de estimulación, se determinó el número de duplicaciones.

Como se muestra en la figura 16, se observó una expansión celular continua de células CD4+ que expresaban CAR (EGFRt+) después de la reestimulación con perlas conjugadas con anti ID, aunque el grado de expansión fue mayor cuando las células se cultivaron en presencia de citocinas. Además, el grado de expansión fue mayor que cuando las células se cultivaron con perlas anti CD3/anti CD28. Para los linfocitos T CD8+, se observó una cinética de expansión similar cuando las células se cultivaron en presencia de perlas conjugadas con anti ID o perlas anti CD3/anti CD28, aunque la expansión fue algo mayor cuando las células se cultivaron con perlas conjugadas con anti ID, particularmente en ausencia de citocinas recombinantes añadidas.

Ejemplo 13: Análisis adicional de la expansión celular específica de CAR mediante perlas conjugadas con anticuerpos antiidiotipo

Se realizaron estudios similares a los descritos en los Ejemplos 11 y 12, excepto que se usaron linfocitos T que expresaban CAR generados a partir de dos pacientes donantes diferentes. Los linfocitos T purificados con CD3 se aislaron de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de dos pacientes donantes, se transdujeron con un vector vírico que codificaba un CAR anti CD19 con un scFv procedente de FMC63, se expandieron en cultivo, se congelaron y se descongelaron.

Se sembraron CD4+, CD8+ descongeladas o cocultivos de CD4/CD8 (relación 1:1) en pocillos de una placa de 6 pocillos a razón de aproximadamente 5×10^6 células totales/pocillo en medio de cultivo que se complementó adicionalmente con citocinas de la siguiente manera: para las células CD4+ o los cocultivos CD4+/CD8+, el medio se complementó con aproximadamente 1200 UI/ml de IL-7 recombinante, 20 UI/ml de IL-15 recombinante y 100 UI/ml de IL-2 recombinante; para las células CD8+ el medio se complementó con 200 UI/ml de IL-2 recombinante y 20 UI/ml de IL-15 recombinante. Se añadieron perlas conjugadas con anti ID B-1 a las células en una relación de célula:perla de 1:1 y se incubaron hasta 9 días con un intercambio de medio del 50 % cada 2-3 días.

En diversos momentos del cultivo, se evaluó el número de células transducidas CD4+ o CD8+ (detectadas por anti EGFR para determinar la expresión del marcador sustituto EGFRt) presentes en el cultivo para cada condición y se determinó el factor de expansión o frecuencia de las células que expresaban CAR como porcentaje de células totales. También se determinó la expresión de PD-1 y CD25 y la viabilidad celular.

Como se muestra en la figura 17A, se observó una expansión de más de 60 veces de linfocitos T CD4+ que expresaban CAR (EGFRt+) cuando las células CD4+ se cultivaron solas con perlas conjugadas con anti ID. Para los linfocitos T CD8+, se produjo una expansión sustancialmente mayor de linfocitos T CD8+ que expresaban CAR (EGFRt+) en presencia de perlas conjugadas con anti ID cuando los linfocitos T CD8+ se cultivaron conjuntamente con células CD4+. Como se muestra en la figura 17B, la frecuencia de CD4+ o CD8+ que expresaban CAR (EGFRt+) aumentó durante los 9 días de cultivo en presencia de las perlas conjugadas con anti ID con >90 % de células transducidas (EGFRt+) presentes en el cultivo el día 9. La viabilidad de las células CD4+ y CD8+ también se mantuvo cercana al 100 % durante el cultivo, con una viabilidad ligeramente mayor de los linfocitos T CD8+ observada cuando se cultivan conjuntamente con linfocitos T CD4+ (figura 17C). Se observaron resultados similares para ambos donantes. Estos resultados son consistentes con un enriquecimiento de linfocitos T con CAR+, sin selección previa de CAR mediante el uso de perlas conjugadas con anticuerpos antiidiotipo específicos de CAR.

La expresión superficial de PD-1 y CD25 en células CD4+ o CD8+ transducidas (EGFRt+) se evaluó por citometría de flujo los días 5, 7 y 9 de cultivo con las perlas conjugadas con anti ID. Como se muestra en la figura 18A, la expresión de PD-1 en los linfocitos T CD4+ y CD8+ disminuyó sustancialmente con el tiempo en cultivos con perlas conjugadas con anti ID. Como se muestra en la figura 18B, la expresión de CD25 también disminuyó después de 9 días de cultivo en presencia de perlas conjugadas con anti ID. Se observaron resultados similares para ambos donantes.

Ejemplo 14: Comparación de los niveles de citocinas y el fenotipo después del cultivo con perlas conjugadas con anticuerpos antiidiotipo

Los linfocitos T purificados con CD3 se aislaron de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de dos pacientes donantes, se transdujeron con un vector vírico que codifica un CAR anti CD19 que tiene un scFv procedente de FMC63 y se expandieron en cultivo con perlas recubiertas con anticuerpos anti CD3 y anti CD28. Después de la expansión, los linfocitos T expandidos se congelaron por criopreservación. Para los estudios, se descongelaron los linfocitos T congelados y se evaluaron los linfocitos T CD4+ y CD8+ para determinar los niveles de citocinas intracelulares o el fenotipo de superficie (d = 0) o se cultivaron linfocitos T CD4+, CD8+ descongelados o CD4+/CD8+ de cocultivo durante 9 días adicionales en presencia de perlas conjugadas con anti ID B-1 antes de evaluar los niveles de citocinas intracelulares y el fenotipo del marcador de superficie después de la estimulación con PMA/ionomicina o células K562 transducidas con CD19 (d = 9).

Para evaluar los niveles de citocinas intracelulares, se añadió inhibidor de Golgi durante 4 horas y a continuación se evaluó TNF α , IFN γ e IL-2 mediante citometría de flujo. Para todas las condiciones, el grado de expresión de citocinas intracelulares fue sustancialmente mayor cuando las células se estimularon con PMA/ionomicina en comparación con la estimulación específica de CAR con células K562 transducidas con CD19. Como se muestra en la figura 19A, los niveles de las citocinas TNF α e IL-2 fueron similares en las células CD4+ o CD8+ inmediatamente después de la descongelación en comparación con las células CD4+ o CD8+ correspondientes o los cocultivos de linfocitos T CD4/CD8, se cultivaron posteriormente en presencia de perlas conjugadas con anti ID durante 9 días. Se observaron niveles aumentados de IFN γ en linfocitos T CD4+, CD8+ descongelados o CD4/CD8 de cocultivo que se cultivaron adicionalmente en presencia de perlas conjugadas con anti ID durante 9 días en comparación con el nivel de IFN γ en linfocitos T CD4+ o CD8+ inmediatamente después de la descongelación. Estos resultados demostraron que la función de los linfocitos T se mantuvo en comparación con los linfocitos T con CAR+ recién descongelados, después de una expansión de 9 días con perlas conjugadas con anti ID. Se obtuvieron resultados similares en células de los dos donantes.

La expresión superficial del marcador de activación CD25, la expresión superficial de los receptores inhibidores PD-1 y LAG-3 y la expresión nuclear del marcador de proliferación Ki-67 también se evaluaron en células CD4+ o CD8+ inmediatamente después de la descongelación (d = 0) o en linfocitos T CD4+ o CD8+ expandidos solos o como un cocultivo CD4/CD8 durante 9 días más en presencia de las perlas conjugadas con anti ID (d = 9). Como se muestra en la figura 19B, se observó una expresión reducida de CD25, pero no de Ki-67, en células que se cultivaron en presencia de perlas conjugadas con anti ID durante 9 días en comparación con los linfocitos T inmediatamente después de la descongelación. La expresión reducida de CD25 fue sustancialmente mayor en las células CD8+ que en las células CD4+. Además, también se observó una disminución de la expresión de PD-1 y LAG-3 en células CD4+ y CD8+ cultivadas solas o como cocultivo de CD4/CD8 después de la incubación durante 9 días con perlas conjugadas con anti ID en comparación con la expresión en células inmediatamente después de la descongelación. Este resultado demostró que después de la incubación con las perlas conjugadas con anti ID, las células transducidas previamente congeladas conservaron su capacidad funcional, como lo demuestra el alto porcentaje de células que fueron positivas para el marcador Ki-67, indicativo de proliferación celular, pero también exhibieron un estado de activación diferente caracterizado por la baja expresión superficial para el marcador de activación CD25 y los marcadores del receptor inhibidor PD-1 y LAG-3.

Ejemplo 15: Efecto de la estimulación de las perlas conjugadas con anti BCMA o perlas conjugadas con anti BCMA/PD-L1 sobre la expresión y/o la señalización de PD-1

Linfocitos T con CAR anti BCMA, generados a partir de muestras de donantes sanos representativos o material procedente de pacientes con mieloma múltiple, y cultivados con 50 μ g/ml de perlas conjugadas con BCMA-Fc (generadas como se ha descrito en el Ejemplo 1) en una relación de 1:1 de perla:linfocito T con CAR+ durante 7 días, en presencia de 1 o 1 μ M de lenalidomida o un control de vehículo. La expresión de CD25, PD-1, Tim3 y Lag3 en linfocitos T con CAR (usando un anticuerpo para el marcador CAR sustituto) cultivados en diferentes condiciones se evaluó a continuación mediante citometría de flujo.

A continuación, a dichos los linfocitos T con CAR anti BCMA preeestimulados con perlas en presencia o ausencia de lenalidomida, o los linfocitos T con CAR anti BCMA recién descongelados generados a partir de muestras de donantes comparables se les retiraron las perlas, se lavaron y se cultivaron con células diana RPMI-8226 (marcadas con NucLight Red (NLR) para permitir su seguimiento mediante microscopía), en presencia de lenalidomida 1 μ M o un control de vehículo. Específicamente, para las células pretratadas en las que se había realizado un pretratamiento en presencia de lenalidomida, las células se cultivaron con las células diana en presencia de lenalidomida; asimismo, para las células pretratadas en las que se había realizado un pretratamiento en presencia de vehículo, las células se cultivaron con las células diana en presencia de vehículo. Después del cocultivo, se evaluó la actividad citolítica midiendo la pérdida de células diana viables durante un período de siete días, según se determinó mediante una señal fluorescente roja. El porcentaje de destrucción se normalizó con respecto a los linfocitos T con CAR anti BCMA preeestimulados en perlas en presencia de vehículo. La producción de citocinas se evaluó mediante ELISA a partir del sobrenadante después del cultivo con células diana durante 24 horas. Los experimentos se realizaron dos veces en 3 donantes. Se usaron modelos lineales de efectos fijos o efectos mixtos para evaluar la significación de los tratamientos

con lenalidomida sobre la actividad citolítica y la producción de citocinas, con el tratamiento, el donante y el tiempo tratados como efectos fijos y el animal tratado como un efecto aleatorio, anidado con el tiempo cuando las mediciones repetidas procedieron del mismo animal. Los valores de P se obtuvieron mediante pruebas de razón de verosimilitud comparando el modelo completo con el efecto de interés frente al modelo sin el efecto de interés.

La figura 20A muestra los resultados de la actividad citolítica específica del antígeno CAR y la figura 20B muestra los resultados de la producción de citocinas para linfocitos T con CAR anti BCMA que se habían estimulado previamente con perlas de BCMA (en comparación con linfocitos T con CAR anti BCMA recién descongelados (no estimulados previamente)) en los cocultivos, comparando las células cultivadas en presencia frente en ausencia de lenalidomida. Los linfocitos T con CAR preestimulados mostraron una actividad citolítica reducida ($P = 2,1 \times 10^{-4}$) y una producción de citocinas reducida ($P = 0,03$ para IFN- γ) en comparación con los linfocitos T con CAR anti BCMA recién descongelados.

En ausencia de lenalidomida en el pretratamiento y el cocultivo posterior, los resultados de los linfocitos T con CAR preestimulados mostraron una reducción de la destrucción celular y la producción de citocinas en comparación con los linfocitos T con CAR frescos, lo que indica que la preestimulación crónica conduce a un deterioro funcional. Estos resultados son consistentes con un fenotipo similar al agotamiento que se ha inducido mediante la preestimulación en las perlas conjugadas con BCMA. La presencia de lenalidomida durante el período de preestimulación conservó la función citolítica ($P = 0,04$), y hubo una tendencia hacia una mayor producción de citocinas en comparación con las células expuestas a vehículo durante el período de preestimulación (figura 24B). La presencia de lenalidomida en este ensayo fue consistente con una observación de que la lenalidomida puede reducir los fenotipos similares al agotamiento funcional en los linfocitos T con CAR preestimulados.

Como se muestra en la figura 20C, se evaluó el fenotipo de los linfocitos T con CAR anti BCMA estimulados durante 7 días en perlas de BCMA, y la adición de lenalidomida aumentó significativamente la viabilidad de CAR+ del material de linfocitos T con CAR anti BCMA en 3 donantes sanos ($P = 0,04$). La adición de lenalidomida no alteró el recuento celular total en los donantes en este período de 7 días, y no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de CAR+ entre los linfocitos T con CAR tratados con vehículo y con lenalidomida. La figura 20D muestra los resultados representativos del análisis citométrico de flujo de la expresión superficial de CD25 y PD-1 (intensidad fluorescente media (MFI), para los linfocitos T con CAR anti BCMA CD4+ o CD8+ después de la estimulación (pretratamiento) con perlas de BCMA durante 7 días, en presencia o ausencia de lenalidomida 1 μ M. Como se muestra, los resultados indicaron que la lenalidomida redujo la expresión de PD-1 de los linfocitos T con CAR BCMA, mientras que aumentó la expresión de CD25 después de una estimulación prolongada. Como se muestra en la figura 20E, el análisis citométrico de flujo en los tres donantes de T con CAR indicó que la adición de lenalidomida aumentó la expresión superficial de Tim3 en la población CD8+ ($P = 4,0 \times 10^{-4}$), con efectos mixtos en la población CD4+ CAR+. En todos los donantes y en las poblaciones CD4+ y CD8+ CAR+, la lenalidomida aumentó CD25 (CD4+ y CD8+; $P = 2,2 \times 10^{-16}$) y el porcentaje positivo para la expresión de Lag3 (CD8+ $P < 0,03$; CD4+ $P = 0,002$). Cabe destacar que también se observó una disminución en el porcentaje de células PD-1+ en la población CD4+ ($P = 0,04$), y 2 de 3 donantes mostraron también una disminución en la población CD8+.

En otro estudio, se usaron perlas conjugadas con BCMA humano recombinante para estimular los linfocitos T con CAR a diversas concentraciones para valorar la magnitud de la estimulación, ya sea estimulación baja (5 μ g/ml), media (50 μ g/ml) y alta (200 μ g/ml). En una condición de estimulación media, se midió la producción de citocinas secretadas 24 horas después de la estimulación, y se observó un aumento del 200 % en las concentraciones de IL-2 y TNF- α en comparación con el control de vehículo, con aumentos dependientes del donante en IFN- γ (figura 21A). Las células se estimularon con perlas conjugadas con BCMA durante 24 horas en presencia de lenalidomida 0,1 μ M o 1,0 μ M o un control de vehículo. Se añadió un inhibidor del transporte de proteínas en las últimas horas de incubación y las células se tiñeron para determinar IL-2, IFN- γ y TNF- α intracelulares.

Los linfocitos T con CAR anti BCMA activados con perlas BCMA mostraron efectos dependientes del nivel de estimulación sobre la producción de citocinas, y las perlas BCMA de 5 μ g causaron una producción limitada de citocinas efectoras de T con CAR en comparación con 50 μ g y 200 μ g de perlas BCMA (figura 21B). La lenalidomida aumentó el porcentaje de tinción intracelular de IFN- γ + y TNF- α + en todos los niveles de estimulación para los linfocitos T con CAR CD4+ y CD8+. La magnitud de la estimulación aumentó o disminuyó la IL-2 en respuesta a la lenalidomida, y la lenalidomida disminuyó el porcentaje de linfocitos T con CAR+ IL-2+ con una estimulación de 50 μ g y 200 μ g, pero aumentó el porcentaje de linfocitos T con CAR+ IL-2+ con la condición de estimulación de 5 μ g. En ausencia de estimulación, la lenalidomida no tuvo efecto sobre la producción de citocinas T con CAR, lo que indica que la mejora de citocinas proporcionada por la lenalidomida requiere estimulación.

En otro estudio, las células se cultivaron en presencia de perlas de BCMA generadas como se ha descrito en el Ejemplo 1, con o sin conjugación adicional de PD-L1-Fc recombinante humana. Los linfocitos T con CAR procedentes de donantes o pacientes sanos se estimularon en presencia de perlas conjugadas con BCMA o perlas conjugadas con BCMA/PD-L1 durante 24 horas en presencia de lenalidomida 1 μ M. La producción de citocinas se midió en el sobrenadante. Los resultados se muestran en la figura 21C. Como se muestra en la figura 25C, la evaluación de linfocitos T con CAR tanto sanos como de pacientes donantes demostró que la adición de PD-L1 recombinante a perlas BCMA recombinantes redujo IFN- γ , IL-2 y TNF- α . Se demostró que el tratamiento con lenalidomida potenció

los niveles de citocinas secretadas más allá de los de los linfocitos T con CAR tratados con vehículo en presencia de PD-L1. Los resultados fueron consistentes con la conclusión de que la producción de citocinas T con CAR anti BCMA después de la incubación con perlas conjugadas con BCMA aumentó con lenalidomida en presencia de inhibición mediada por PD-L1.

5 **Ejemplo 16: Evaluación de la producción de citocinas por linfocitos T con CAR anti BCMA estimulados con perlas conjugadas con BCMA**

10 Los linfocitos T con CAR anti BCMA se generaron generalmente como se ha descrito en el Ejemplo 2. Los linfocitos T con CAR anti BCMA se formularon en una relación de 1:1 de linfocitos T CD4+ y CD8+ y se descongelaron y se cultivaron a razón de $5,0 \times 10^5$ células por pocillo en una placa de 96 pocillos. Se añadieron perlas conjugadas con anticuerpo anti CD3/anti CD28 o perlas conjugadas con BCMA de 4,5 o 2,8 μm de diámetro (de una composición de perlas conjugadas con BCMA de 5 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ o 200 $\mu\text{g/ml}$ generada como se ha descrito en el Ejemplo 1) a los cultivos en una relación de linfocitos T con CAR anti BCMA con respecto a perlas de 1:1. Los linfocitos T con CAR anti BCMA cultivados en ausencia de perlas conjugadas con anticuerpos anti CD3/anti CD28 o BCMA sirvieron como controles.

20 Después de una incubación de veinticuatro horas, la presencia de IFN-gamma, IL-2, TNF-alfa, IL-6, GM-CSF e IL-4 en los sobrenadantes de cultivo se evaluó usando un inmunoensayo de citocinas multiplex (Luminex®). Como se muestra en la figura 22A, la incubación con perlas conjugadas con anticuerpos anti CD3/anti CD28 dio como resultado concentraciones más altas de citocinas presentes en el sobrenadante en comparación con la incubación con perlas conjugadas con BCMA. En este ensayo, la magnitud de la producción de citocinas a partir de células incubadas con perlas conjugadas con BCMA dependía de la dosis, y se correlacionaba con concentraciones crecientes de BCMA (es decir, 5 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ o 200 $\mu\text{g/ml}$) usadas para la conjugación de perlas. Este resultado es coherente con un hallazgo de que la activación de CAR dirigida por BCMA podría controlarse y valorarse variando la cantidad de BCMA conjugado con las perlas. Las comparaciones de la liberación de citocinas después de la incubación con perlas conjugadas con anticuerpos anti CD3/anti CD28 o perlas conjugadas con BCMA revelaron diferencias en la magnitud y calidad de la producción de citocinas, con un perfil de liberación de citocinas más similar al de Th1 observado después de la estimulación con perlas conjugadas con BCMA.

30 Los linfocitos T con CAR anti BCMA se cultivaron como se ha descrito anteriormente y se evaluaron para determinar los niveles intracelulares de citocinas mediante citometría de flujo. Los linfocitos T con CAR anti BCMA se incubaron con perlas conjugadas con anticuerpos anti CD3/anti CD28 o perlas conjugadas con BCMA en una relación de linfocitos T con CAR anti BCMA con respecto a perlas de 1:1 durante veinte horas, seguido de una incubación de cuatro horas con un inhibidor del transporte de proteínas. Las células se tiñeron para determinar su viabilidad, la expresión de CAR, CD4 y CD8, a continuación se fijaron, se permeabilizaron y se tiñeron para determinar los niveles intracelulares de IFN-gamma, IL-2 y TNF-alfa. Como se muestra en la figura 22B, la estimulación con perlas conjugadas con BCMA dio como resultado la producción de citocinas tanto en células CD4+ como CD8+ que expresaban CAR anti BCMA. De manera similar a lo anterior, la magnitud de los niveles intracelulares de citocinas parecía correlacionarse con la cantidad de BCMA conjugado con las perlas.

40 **Ejemplo 17: Generación de perlas conjugadas con anticuerpos anti CD19, anti ID y anti CD2**

45 Se generaron perlas recubiertas con anticuerpos anti CD2, anti CD19 y anti ID. El anticuerpo anti CD2 de ratón (clon RPA-2.10, ED biosciences) y el anticuerpo idiotype antiidiotype anti ID B-2 descrito en el Ejemplo 9 se acoplaron covalentemente a la superficie de una superparamagnética activada con tosilo disponible comercialmente que tenía un diámetro de aproximadamente 4,5 μm (denominadas M-450; ThermoFisher, Waltham MA).

50 Se añadieron aproximadamente $6,67 \times 10^{-10}$ moles de cada anticuerpo por cada 1 ml de perlas activadas con tosilo (por ejemplo, aproximadamente 4×10^8 perlas/ml) y el acoplamiento covalente se realizó mediante incubación durante una noche a 37 °C en una solución tamponada con fosfato (PBS) que contenía seroalbúmina humana (HSA) al 0,1 %. Las perlas se lavaron y se suspendieron de nuevo en 1 ml de PBS con HSA al 0,1 %. Tras la conjugación, la concentración de perlas se determinó usando un celómetro. Basándose en la concentración de acoplamiento y el recuento de perlas, el número aproximado de moléculas en las perlas fue de $1,58 \times 10^6$ moléculas de anticuerpo por perla. Las perlas recubiertas con anticuerpo se suspendieron en una solución a una concentración de $4,1 \times 10^8$ perlas/ml.

60 La estabilidad de las perlas conjugadas con anticuerpo se evaluó mediante la granulación de las perlas conjugadas con anticuerpo, haciendo pasar el sobrenadante resultante sobre un gel Bis-Tris al 4-12 % y tiñendo el gel para determinar la proteína con azul de Coomassie. Como control de la proteína total conjugada en las perlas, también se evaluó una muestra de 10 μl de sobrenadante de perlas granuladas que se hirvieron en tampón de muestra LDS. Los controles también incluyeron la evaluación de 1 μg de anticuerpo anti CD2, 1 μg de anticuerpo anti ID B-2 que no se había conjugado con las perlas (controles positivos) y 5 μl de HSA al 0,1 % (control negativo). Se detectaron bandas correspondientes a los anticuerpos en la muestra con el sobrenadante de la muestra hervida. No se detectó ningún anticuerpo anti ID en el sobrenadante de las muestras conjugadas que no se habían hervido, lo que es coherente con una conjugación estable.

Ejemplo 18: Generación de perlas conjugadas con anticuerpos anti CD19, anti ID y anti CD28

Se generaron perlas recubiertas con anticuerpos anti CD28, anti CD19 y anti ID. El anticuerpo anti CD28 de ratón (clon purificado CD28.2 sin azida (LEAF) y endotoxina baja (Biolegend)) y el anticuerpo anti ID idiotype B-2 descrito en el Ejemplo 9 se acoplaron covalentemente a la superficie de una superparamagnética activada con tosilo disponible comercialmente que tenía un diámetro de aproximadamente 4,5 μm (denominadas M-450; ThermoFisher, Waltham MA). Se añadieron aproximadamente $6,67 \times 10^{-10}$ moles de cada anticuerpo por 1 ml de las perlas activadas con tosilo (por ejemplo, aproximadamente 4×10^8 perlas/ml) y se acoplaron covalentemente sustancialmente como se ha descrito en el Ejemplo 17. Basándose en la concentración de acoplamiento y el recuento de perlas, el número aproximado de moléculas en las perlas fue de $1,79 \times 10^6$ moléculas de anticuerpo por perla. Las perlas recubiertas con anticuerpo se suspendieron en una solución a una concentración de $3,2 \times 10^8$ perlas/ml según lo determinado con un celómetro.

Ejemplo 19: Generación de perlas que contienen anticuerpo anti CD19 conjugado en la superficie, anticuerpo anti ID, anticuerpo anti CD2 y anticuerpo anti CD28

Se generaron perlas paramagnéticas recubiertas con anticuerpo anti CD2, anti CD28 y anti CD19 y perlas recubiertas con anticuerpo anti ID. El anticuerpo anti CD2 de ratón (clon RPA-2.10, ED biosciences), el anticuerpo anti CD28 de ratón (clon purificado LEAF CD28.2, Biolegend) y el anticuerpo anti ID idiotype B-2 descrito en el Ejemplo 9 se acoplaron covalentemente a la superficie de una superparamagnética activada con tosilo disponible comercialmente que tenía un diámetro de aproximadamente 4,5 μm (denominadas M-450; ThermoFisher, Waltham MA).

Se añadieron aproximadamente $4,44 \times 10^{-10}$ moles de cada anticuerpo por 1 ml de las perlas activadas con tosilo (por ejemplo, aproximadamente 4×10^8 perlas/ml) y se acoplaron covalentemente sustancialmente como se ha descrito en el Ejemplo 17. Basándose en la concentración de acoplamiento y el recuento de perlas, el número aproximado de moléculas en las perlas fue de $1,56 \times 10^6$ moléculas de anticuerpo por perla. Las perlas recubiertas con anticuerpo se suspendieron en una solución a una concentración de $3,91 \times 10^8$ perlas/ml.

La estabilidad de las perlas conjugadas con anticuerpo se evaluó mediante la granulación de las perlas conjugadas con anticuerpo, haciendo pasar el sobrenadante resultante sobre un gel Bis-Tris al 4-12 % y tiñendo el gel para determinar la proteína con azul de Coomassie. Como control de la proteína total conjugada en las perlas, se evaluaron 10 μl de sobrenadante de perlas granuladas que se hirvieron en tampón de muestra LDS. Como controles adicionales también se evaluaron 1 μg de anticuerpo anti CD2, 1 μg de anticuerpo anti ID B-2 que no se había conjugado con las perlas (controles positivos) y 5 μl de HSA al 0,1 % (control negativo). No se detectó ningún anticuerpo anti ID en el sobrenadante de las muestras conjugadas que no habían sido hervidas, lo que indica que la conjugación era estable, mientras que se detectaron bandas correspondientes a los anticuerpos en el sobrenadante cargado de la muestra hervida.

Ejemplo 20: Ensayo *in vitro* para la estimulación crónica de linfocitos T con CAR+ utilizando perlas conjugadas con anti ID

Se aislaron composiciones separadas de células CD4+ y CD8+ de donantes humanos, se activaron y se transdujeron con un vector vírico que codificaba un CAR anti CD19 que tenía un scFv procedente de FMC63. A continuación, se recogieron, se formularon y se criocongelaron por separado linfocitos T CD4+ y CD8+ de cada donante. Los linfocitos T CD4+ y CD8+ genomanipulados criocongelados se descongelaron y se formularon en una relación 1:1 de linfocitos T CD4+ y CD8+ del mismo donante para generar una composición de linfocitos T que contenía linfocitos T con CAR+. Las perlas conjugadas con anti ID contra el CAR anti CD19 se incubaron con células en una relación 1:1 de perla:célula durante 14 días.

La respuesta secundaria de los linfocitos T con CAR recogidas el día 14 después de la estimulación específica de CAR con perlas conjugadas con anti ID (día 14; secundarias) se evaluó después de la estimulación con células diana que expresaban antígeno K562-CD19 en una relación de efector con respecto a diana de 1:1 (para evaluar los niveles de citocinas) o 3:1 para evaluar la actividad citolítica. La respuesta primaria de los linfocitos T de la composición de linfocitos T que no se había incubado con las perlas conjugadas con anti ID también se determinó mediante una estimulación similar con células que expresaban antígeno (día 0; "primaria"). Para evaluar la actividad citolítica, las células diana se marcaron con NucLight Red (NLR) para permitir el seguimiento mediante microscopía de fluorescencia. La actividad de destrucción se evaluó midiendo la pérdida de células diana viables durante 72 horas, según lo determinado por la pérdida de la señal fluorescente en el tiempo mediante microscopía de fluorescencia cinética (usando el sistema de análisis de células vivas INCUCYTE®, Essen Bioscience). El índice de destrucción se determinó como la inversa del área bajo la curva (AUC) para la fluorescencia diana en el tiempo. Los niveles intracelulares de citocinas IL-2 y TNF-alfa también se evaluaron mediante citometría de flujo en linfocitos T cocultivados después de la incubación en presencia de un inhibidor de Golgi.

Como se muestra en la figura 23A, la destrucción de células diana por una composición de linfocitos T que contenía linfocitos T con CAR+ recogidos después de la estimulación específica de CAR durante 14 días con perlas conjugadas

con anti ID se redujo en comparación con la actividad citolítica de los linfocitos T con CAR+ que no se sometieron a una estimulación específica de CAR previa. Los niveles intracelulares de citocinas IL-2 y TNF-alfa también se redujeron en los linfocitos T con CAR+ que habían recibido estimulación específica de CAR a largo plazo con las perlas conjugadas con anti ID (figura 23B). Estos resultados son consistentes con una observación de que la estimulación

El ensayo de estimulación crónica descrito anteriormente se usó para evaluar los efectos de diversos compuestos en la mejora de la función de los linfocitos T con CAR+ después de la estimulación a largo plazo. Las composiciones de linfocitos T con CAR+ anti CD19 se generaron como se ha descrito anteriormente, excepto en presencia de un compuesto diferente o un control de vehículo. Las células de cada composición de linfocitos T con CAR generada se incubaron con perlas paramagnéticas conjugadas con anti ID en una relación de perla con respecto a célula de 1:1 durante 14 días.

La respuesta primaria de las composiciones de linfocitos T con CAR en la descongelación (sin estimulación con perlas conjugadas con anti ID) o la respuesta secundaria de las composiciones de linfocitos T con CAR estimuladas con CAR (después de 14 días de estimulación específica con CAR con perlas conjugadas con anti ID) se evaluó después de la estimulación con células que expresan antígeno. Las composiciones de linfocitos T con CAR se cultivaron 1:1 con células que expresan antígeno K562-CD19 en presencia de un inhibidor de Golgi, y se evaluó la producción de citocinas polifuncionales mediante citometría de flujo después de la tinción de citocinas intracelulares para IL-2, IFN-gamma y TNF-alfa. Se determinó una puntuación polifuncional a partir de los niveles acumulativos de citocinas según se determinó en células CD8+ después de que los datos se normalizaran mediante escalado dentro de las cohortes de donantes (figura 24A). Se determinaron las citocinas IL-2, TNF e IFN-gamma secretadas totales del sobrenadante de cultivo celular de cocultivos después de 20 horas de incubación con células diana, y se calculó el promedio de las puntuaciones escaladas para las tres citocinas como se muestra en la figura 24B. Como se muestra en las figuras 24A y 24B, determinados compuestos dieron como resultado respuestas primarias o secundarias mejoradas en función de la capacidad de las composiciones de linfocitos T con CAR para producir citocinas. También se observaron mejoras en la respuesta citolítica primaria o secundaria, después del cocultivo con células diana en una relación de efector:diana de 3:1 como se ha descrito anteriormente, entre las composiciones de linfocitos T producidas en presencia de determinados compuestos (figura 24C).

Estos resultados demuestran la utilidad del ensayo de estimulación crónica para evaluar composiciones de linfocitos T con CAR, incluyendo diferentes composiciones de linfocitos T con CAR producidas en diferentes condiciones o en presencia de compuestos u otros agentes, en cuanto a su capacidad para exhibir supervivencia a largo plazo y/o mantener la función después de la estimulación crónica de linfocitos T con CAR, como puede ocurrir después de una exposición prolongada al antígeno *in vivo*.

Ejemplo 21: Evaluación funcional de linfocitos T transducidos con el receptor de antígeno quimérico (CAR) (linfocitos T con CAR) expandidos en presencia de compuestos de molécula pequeña

Se generaron composiciones de linfocitos T genomanipuladas que contenían linfocitos T que expresan un CAR anti CD19 a partir de tres donantes separados en presencia de diferentes compuestos o un control de vehículo.

La capacidad de las células de las diferentes composiciones de linfocitos T para expandirse después de la estimulación del CAR se evaluó incubando células de las composiciones de linfocitos T con CAR anti CD19 generadas con una superficie de perlas conjugada con un anticuerpo antiidiotipo específico para el CAR anti CD19. Las perlas conjugadas con anti ID se incubaron con células en una relación de perlas:células de 1:1 en pocillos de recipientes de expansión G-rex de 24 pocillos (Argos Technologies) durante 15 días. Los linfocitos T vivos totales por pocillo se determinaron contando las células en los cultivos cada 5 días (figura 25A). El área media bajo la curva (AUC) de la función del número de linfocitos T en el tiempo se calculó en relación con el AUC de las células expandidas solo con medio (figura 25B).

Como se muestra en la figura 25A, la estimulación de células con perlas conjugadas con anticuerpos antiidiotipo dio como resultado una expansión inicial que vino seguida de una disminución en el número de células. Los linfocitos T de composiciones de linfocitos T con CAR anti CD19 generadas que se habían expandido previamente mediante incubación con los compuestos tenían un AUC medio mayor en comparación con los linfocitos T expandidos previamente con el control de vehículo (figura 25B). Los resultados indican que la presencia de un ensayo de estimulación a largo plazo se puede utilizar para identificar compuestos que, en algunos casos, mejoran la capacidad de las composiciones de linfocitos T generadas para expandirse y sobrevivir después de una única estimulación específica de CAR.

La respuesta secundaria de las citocinas después de la estimulación con células que expresan antígeno se evaluó en linfocitos T con CAR a partir de las composiciones de linfocitos T recogidos el día 11 después de la expansión con perlas conjugadas con anti ID. Las células estimuladas con anti ID se incubaron con células diana K562-CD19 irradiadas en una relación de efector:diana de 1:1 durante aproximadamente 16 horas. Se recogió el sobrenadante y se midió la producción de citocinas TNF-alfa, IFN-gamma e IL-2 usando un ensayo Luminex Multiplex. El factor de

- cambio de la producción de citocinas observado en los sobrenadantes de cocultivo se determinó a partir de composiciones de linfocitos T con CAR anti CD19 generadas expandidas en presencia de compuestos o control de vehículo en comparación con células expandidas solo en medio. Como se muestra en la figura 25C, este ensayo identificó composiciones de linfocitos T, generadas a partir de composiciones de linfocitos T con CAR anti CD19 que se habían expandido previamente en presencia de determinados compuestos, que exhibieron una producción secundaria de citocinas mejorada después de la estimulación posterior con antígeno. Además, el ensayo identificó una composición de linfocitos T de algunas células procedentes de donantes, que cuando se genomanipularon y se expandieron en presencia de un compuesto, exhibieron una mayor frecuencia de linfocitos T CD8+ que eran células CD107a+IFN γ + el día 11, según se determinó mediante tinción intracelular de citocinas después de la incubación con inhibidor de Golgi durante 4 horas sustancialmente como se ha descrito anteriormente (figura 25D). Estos resultados son consistentes con el uso de un ensayo de estimulación a largo plazo para identificar los efectos de los compuestos usados en el proceso para genomanipular linfocitos T para mejorar la función de la composición de linfocitos T genomanipulada.
- La presente invención no pretende limitarse en alcance a las realizaciones particulares divulgadas, que se proporcionan, por ejemplo, para ilustrar diversos aspectos de la invención. Diversas modificaciones de las composiciones y métodos descritos resultarán evidentes a partir de la descripción y enseñanzas del presente documento.

20 SECUENCIAS

N.º	SECUENCIA	COMENTARIO
1	MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPLTCQRYCNASVT NSVKGTNA	Dominio extracelular de BCMA humano (N.º de GenBank NP 001183.2)
2	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Fc de IgG1 humana
3	GLNDIFEAQKIEWHE	Etiqueta Avi
4	KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL	Etiqueta de calmodulina
5	FFFFFFF	Etiqueta de poliglutamina
6	DYKDDDDK	Etiqueta Flag
7	YPYDVPDYA	Etiqueta HA
8	EQKLISEEDL	Etiqueta Myc
9	Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (WRHPQFGG)	Secuencia peptídica de unión a estreptavidina STREP-TAG® I
10	Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (WSHPQFEK)	Secuencia peptídica de unión a estreptavidina STREP-TAG® II
11	His-Pro-Baa (HPX)	- Péptido de unión a estreptavidina - X se selecciona de glutamina, asparagina y metionina
12	His-Pro-Gln-Phe (HPQF)	Péptido de unión a estreptavidina
13	Oaa-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa (XX HPQFXX)	Péptido de unión a estreptavidina Oaa es Trp, Lys o Arg Xaa es cualquier aminoácido; Yaa es Gly o Glu Zaa es Gly, Lys o Arg

(continuación)

N.º	SECUENCIA	COMENTARIO
14	Trp-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa (WXHPQFXX)	Péptido de unión a estreptavidina Xaa es cualquier aminoácido; Yaa es Gly o Glu, Zaa es Gly, Lys o Arg
15	Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(Xaa) _n -Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys- (Xaa es cualquier aminoácido; n es 8 o 12)	Péptido de unión a estreptavidina
	(WSHPQFEKX _n WSHPQFEK)	(Xaa es cualquier aminoácido; n es 8 o 12)
16	Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer) _n -Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (n es 2 o 3) (WSHPQFEK(GGGG) _n WSHPQFEK	Péptido de unión a estreptavidina (n es 2 o 3)
17	SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWHPQFEK	Péptido de unión a estreptavidina
18	SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK	Péptido de unión a estreptavidina
19	WSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWHPQFEK	Péptido de unión a estreptavidina
20	WSHPQFEKGGGSGGGSWHPQFEK	Péptido de unión a estreptavidina
21	WSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK	Péptido de unión a estreptavidina
22	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYESA VGNAESRYVLTGRYDSAPATDGGSTALGWTVAWKNNYRNAHSAT TWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKP SAASIDAACKAGVNNGNPLDAVQQ	Secuencia de estreptavidina de tipo natural (Especie de estreptavidina: <i>Streptomyces avidinii</i> - UniProt N.º P22629)
23	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYVTARGNAESRYVLTGR YDSAPATDGGSTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEAR INTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	mutéina estreptavidina denominada Strep-tactin®
24	MGKSKEISQDLRKKIVDLHKSGSSLGAISKRLKVPRSSVQTIVRKYK HHGTTQPSYRSGRRRLVSPRDERTLVKRVQINPRTTAKDLVKMLEE TGTKVSISTVKRVLYRHNKGRSARKKPLLQNRHKKARLRFATAHG DKDRTFWRNVLWSDETKIELFGHNDHRYVWRKKGEACKPKNTIPT VKHGGGSIMLWCGFAAGGTGALHKIDGIMRKENYVDILKQHLKTS VRKLLKGRKWVFMNDNDPKHTSKVYVAKWLKDNKVKLEWPSQSP DLNPIENLWAEKKRVRARRPTNLTLQLHQLCQEEWAKIHPTYCGKL VEGYPKRLTQVKQFKGNATKY	Transposasa <i>Bella Durmiente</i>

(continuación)

N.º	SECUENCIA	COMENTARIO
25	ATGGGAAAATCAAAAGAAATCAGCCAAGACCTCAGAAAAA AAATTGTAGACCTCCACAAGTCTGGTTCATCCTTGGGAGCAATTT CCAAACGCCTGAAAGTACCACGTTTCATCTGTACAATCTGGTTCAT CCTTGGGAGCAATTTCCAAACGCCTGAAAGTACCACGTTTCATCTG TACAAACAATAGTACGCAAGTATAAACACCATGGGACCACGCAG CCGTCATACCGCTCAGGAAGG AGACGCGTTCTGTCTCCTAGAGATGAACGT ACTTTGGTGCAGAAAAGTGCAAATCAATCCCAGAACACAGCAAA GGACCTTGTGAAGATGCTGGAGGAAACAGGTACAAAAGTATCTA TA TCCACAGTAAAACGAGTCTTATATCGACATAACCTGAAAGGCCG CTCAGCAAGGAAGAAGCCACTGCTCCAAAACCGACATAAGAAAG CCAGACTACGGTTTGCAACTGCACATGGGGACAAAGATCGTACT TTTTGGAGAAATGTCTCTGGTCTGATGAAACAAAAATAGAACTG TTT GGCCATAATGACCATCGTTATGTTTGGAGGAAGAAGGGGGAGGC TTGCAAGCCGAAGAACACCATCCCAACCGTGAAGCACGGGGGTG GCAGCATCATGTTGTGGGGGTGCTTTGCTGCAGGAGGGACTGGTG CACTTCA CAAAATAGATGGCATCATGAGGAAGGAAAAATTATGTGGAT ATATTGAAGCAACATCTCAAGACATGAGTCAGGAAGTTAAAGCT TGGTCGCAAATGGGTCTTCCAAATGGACAATGACCCCAAGCATA CTTCCAAAGTTGTGGCAAAATGGCTTAAGGACAACAAAGTCAAG GTATTGGAGTGGCCATCACAAAGCCCTG ACCTCAATCCTATAGAAAAAT TTGTGGGCAGAACTGAAAAAGCGTGTGCGAGCAAGGAGGCCTAC AAACCTGACTCAGTTACACCAGCTCTGTCAGGAGGAATGGGCCA AAATTCACCCAACTTATTGTGGGAAGCTTGTGGAAGGCTACCCGA AACGTTTGACCCAAGTTAAACAATTTAAAGGCAATGCTACCAAAT AC TAG	Gen que codifica la transposasa <i>Bella Durmiente</i>
26	cagttgaagtgggaagttacatacacttaagttggagtcattaaaactegttttcaactacTccacaaatttett gtlaacaacaatagttttggcaagtcagttagacatcttctgtcatgacacaagtcattttccaacaatig ttfacagacagattatttcaactataattcaactgtatcacaattccagttgggcagaagttacatacactaagttga ctgtgctttaaacagcttggaaaattccagaaaatgatgcatggtcttagaagcttctgatagactaattgaca tcatttgaagtcattggaggtgtacctgtggatgtatttcaagg	Secuencia de repetición invertida <i>Bella Durmiente</i>
27	GGGGS	Secuencia enlazadora
28	PKSSDKTHTCPPEPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Fc de IgG1 humana modificado
29	DSSKWVFEHPETLYAWEGACVWIPCTYRALDGDLESFILFHNPEYN KNTSKFDGTRLYESKDGKVPSEQKRQVFLGDKNKNCTLSIHPVHL NDSGQLGLRMESKTEKWMERIHLNVSEPFPPHIQLPPEIQESQEVTL TCLLNFSCYGYPIQLQWLLEGVPMRQAAVTSTSLTIKSVFTRSELKFS PQWSHHGKIVTCQLQDADGKFLSNDTVQLNVKHTPKLEIKVTPSDAI VREGDSVTMTCEVSSNPEYTTVSWLKDGTSLKKQNTFTLNLREVT KDQSGKYCCQVSNVGPGRSEEVFLQVQYAPEPSTVQILHSPAVEG SQVEFLCMSLANPLPTNYTWYHNGKEMQGRTEEKVHIPKILPWHAG TYSCVAENILGTGQRGPGAELDVQYPPKKVTTVIQNPMPIREGDTV LSCNYNSSNPSVTRYEWKPHGAWEEPGLVGLKIQNVGWDNTTIACA ACNSWCWSASPVALNVQYAPRDVVRKIKPLSEIHSGNSVSLQCDF SSSHPKEVQFFWEKNGRLLGKESQLNFDNISPEDAGSYSCWVNNSIG QTASKAWTLEVLYAPRRLRVSMSPGDQVMEGKSATLTCESDANPP VSHYTWFWDWNNQSLPYHSQKLRLPEPVKVQHSGAYWCQGTNSVGK GRSPLSTLTVYYSPETIGRR	Dominio extracelular de CD22 humano
30	MPLLLLLLPLWAGALA	Péptido señal CD33

(continuación)

N.º	SECUENCIA	COMENTARIO
31	QETELSVSAELVPTSSWNISSELNKDSYLTLDPEPMNNITTSLGQTAE HCKVSGNPPPTIRWFKNDAPVVQEPRLSFRSTIYGSRLRIRNLDTTD	Fragmento ROR1 humano
	TGYFQCVATNGKEVVSSTGVLFVKFGPPPTASPGYSDEYEEDGFCQP YRGIA CARFIGNRTVY MESLHMQGEIENQITAAFTMIGTSSHLSDKC SQFAIPSLCHYAFPYCDETSSVPKPRDLRDECEILENVLCQTEYIFAR SNPMILMRLKLPNCEDLPQPESPEAANCIRIGIPMADPINKNHKCYNS TGVDYRGTVSVTKSGRQCQPWNSQYPHTHTFTALRFPELNGGHSYC RNPNGNQKEAPWCFTLDENFKSDLCDIPACDSKDSKEKNKMEILY	
32	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A
33	QETELSVSAELVPTSSWNISSELNKDSYLTLDPEPMNNITTSLGQTAE HCKVSGNPPPTIRWFKNDAPVVQEPRLSFRSTIYGSRLRIRNLDTTD TGYFQCVATNGKEVVSSTGVLFVKFGPPPTASPGYSDEYEEDGFCQP YRGIA CARFIGNRTVY MESLHMQGEIENQITAAFTMIGTSSHLSDKC SQFAIPSLCHYAFPYCDETSSVPKPRDLRDECEILENVLCQTEYIFAR SNPMILMRLKLPNCEDLPQPESPEAANCIRIGIPMADPINKNHKCYNS TGVDYRGTVSVTKSGRQCQPWNSQYPHTHTFTALRFPELNGGHSYC RNPNGNQKEAPWCFTLDENFKSDLCDIPACDSKDSKEKNKMEILYGG GGSPKSSDKTHTCPPCAPEAEAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K	Polipéptido de fusión ROR1- Fc
34	DSSKWVFEHPETLYAWEGACVWIPCTYRALDGDLESFILFHNPEYN KNTSKFDGTRLYES TKDGKVPSEQKRVQFLGDKNKNCTLSIHPVHL NDSGQLGLRMESKTEKWMERIHNLVSERPFPPIQLPPEIQESQEVTL TCLLNFCYGYPIQLQWLLEGVPMRQAAVTSTSLTIKSVFTRSELKFS PQWSHHGKIVTCQLQDADGKFLSNDTVQLNVKHTPKLEIKVTPSDAI VREGDSVTMTCEVSSSNPEYTTVSWLKDGTSLKKQNTFTLNLREVT KDQSGKYCCQVSNVGPGRSEEVFLQVQYAPPESTVQILHSPAVEG SQVEFLCMSLANPLPTNYTWYHNGKEMQGRTEEKVHIPKILPWHAG TYSVAENILGTGQRGPGAELDVQYPPKKVTTVIQNPMPIREGDTV LSCNYNSSNPSVTRYEWKPHGAWEEP SLGV LKIQNVGWDNTTIACA ACNSWCWSPVALNVQYAPRDVVRKIKPLSEIHSGNSVSLQCDF SSSHPKVEVQFFWEKNGRLLGKESQLNFD SISPEDAGSYSCWVNNSIG QTASKAWTLEVLYAPRRLRVSMSPGDQVMEGKSATLTCESDANPP VSHYTWFWDWNNQSLPYHSQKLRLPEVKVQHS GAYWCQGTNSVGK GRSPLSTLTVYYSPETIGRRGGGSPKSSDKTHTCPPCAPEAEAGAPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Polipéptido de fusión CD22- Fc
35	MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSTNPPLTCQRYCNASVT NSVKGTNAGGGGSPKSSDKTHTCPPCAPEAEAGAPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	Polipéptido de fusión BCMA- Fc
36	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISKASGYAFSSYWMNVVKQRPGQGL EWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDS AVYFCARKTISSVDFYFDYWGQGTITVTVSS	VH de SJ25C1
37	DIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKP LIYSATYRNSGVPRFTGSGSGTDFLTITNVQSKDLADYFCQQYNR YPYTSGGGTKLEIKR	VL de SJ25C1

(continuación)

N.º	SECUENCIA	COMENTARIO
38	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEW LGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYY CAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS	VH de FMC63
39	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLL IYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLP YTFGGGKLEIT	VL de FMC63
40	SYWMN	CDR1 de HC de SJ25C1
41	QIYPGDGDINYNKFKG	CDR2 de HC de SJ25C1
42	KTISSVVDYFDY	CDR3 de HC de SJ25C1
43	KASQNVGTNVA	CDR1 de LC de SJ25C1
44	SATYRNS	CDR2 de LC de SJ25C1
45	QQYNRYPYT	CDR3 de LC de SJ25C1
46	DYGVS	CDR1 de HC de FMC63
47	VIWGSETTYNSALKS	CDR2 de HC de FMC63
48	HYYYGGSYAMDY	CDR3 de HC de FMC63
49	RASQDISKYLN	CDR1 de LC de FMC63
50	HTSRLHS	CDR2 de LC de FMC63
51	QQGNTLPYT	CDR3 de LC de FMC63
52	QVQLQQPGSELVRPGGSVKLSCKASDYTFTSYWMHWVRQRPQGL EWIGNIYPGSGGTNYDEKFKRKATLTVDTSSTAYMQLRSLTSEDSA VYYCTREVTTVAYYYSMYWGQGTSVTVSS	VH de anti ID
53	EVTTVAYYYSMY	CDR3 de HC de anti ID
54	TREVTTVAYYYSMY	CDR3 de HC de anti ID
55	SYWMH	CDR1 de HC de anti ID
56	DYTFTSY	CDR1 de HC de anti ID
57	DYTFTSYWMH	CDR1 de HC de anti ID
58	TSYWMH	CDR1 de HC de anti ID
59	NIYPGSGGTNYDEKFKR	CDR2 de CH de anti ID
60	YPGSGG	CDR2 de CH de anti ID
61	NIYPGSGGTN	CDR2 de CH de anti ID
62	WIGNIYPGSGGTN	CDR2 de CH de anti ID
63	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLL IYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGKTVP FTFGSGTKLEIK	VL de anti ID
64	QQGKTVPFT	CDR3 de LC de anti ID
65	QQGKTVPF	CDR3 de LC de anti ID
66	RASQDISNYLN	CDR1 de LC de anti ID
67	SNYLNWY	CDR1 de LC de anti ID
68	YTSRLHS	CDR2 de LC de anti ID
69	LLIYYTSRLH	CDR2 de LC de anti ID
70	GGGS	Enlazador 3GS

(continuación)

N.º	SECUENCIA	COMENTARIO
71	GGGGSGGGSGGGGS	Enlazador
72	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	Enlazador
73	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYMKWVKQCHGKS LEWIGDINPNNGGTDYNQNFKGKATLTVDKSSSTAYMQLNSLTSED SAVYYCAREGNNYGSRDAMDYWGQGTSTVTVSS	VH de anti ID B-1
74	QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKTSGYSFTRYWMNWKQRPQGQ	VH de anti ID B-2
	LEWIGMIHPDSETRLNQKFKDKATLTVDNSSSTAYMQLSSPTSEDS AVYYCASIYYEEAWGQGTSLTVSA	
75	EGNNYGSRDAMDY	CDR3 de HC de anti ID B-1
76	IYYEEA	CDR3 de HC de anti ID B-2
77	AREGNNYGSRDAMD	CDR3 de HC de anti ID B-1
78	ASIYYEE	CDR3 de HC de anti ID B-2
79	DYYMK	CDR1 de HC de anti ID B-1
80	RYWMN	CDR1 de HC de anti ID B-2
81	GYTFTDY	CDR1 de HC de anti ID B-1
82	GYTFTDYMK	CDR1 de HC de anti ID B-1
83	TDYYMK	CDR1 de HC de anti ID B-1
84	GYSFTRY	CDR1 de HC de anti ID B-2
85	GYSFTRYWMN	CDR1 de HC de anti ID B-2
86	TRYWMN	CDR1 de HC de anti ID B-2
87	DINPNNGGTDYNQNFKG	CDR2 de HC de anti ID B-1
88	MIHPDSETRLNQKFKD	CDR2 de HC de anti ID B-2
89	NPNNGG	CDR2 de HC de anti ID B-1
90	DINPNNGGTD	CDR2 de HC de anti ID B-1
91	WIGDINPNNGGTD	CDR2 de HC de anti ID B-1
92	HPDSE	CDR2 de HC de anti ID B-2
93	MIHPDSETR	CDR2 de HC de anti ID B-2
94	WIGMIHPDSETR	CDR2 de HC de anti ID B-2
95	GYX ₃ FX ₅ X ₆ YX ₈ MX ₁₀ X ₃ = T o S; X ₅ = T o S; X ₆ = D o R; X ₈ = Y o W; X ₁₀ = K o N	Consenso CDR1 de HC

(continuación)

N.º	SECUENCIA	COMENTARIO
96	WIGX ₄ IX ₆ PX ₈ X ₉ X ₁₀ X ₁₁ TX ₁₃ X ₁₄ NQX ₁₇ FKX ₂₀ X ₄ = D o M; X ₆ = N o H; X ₈ = N o S; X ₉ = N o D; X ₁₀ = G o S; X ₁₁ = G o E; X ₁₃ = D o R; X ₁₄ = Y o L; X ₁₇ = N o K; X ₂₀ = G o D	Consenso CDR2 de HC
97	AX ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ X ₁₀ X ₁₁ X ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₂ = R o S; X ₃ = E o I; X ₄ = G o Y; X ₅ = N o Y; X ₆ = N o E; X ₇ = Y o nulo; X ₈ = G o nulo; X ₉ = S o nulo; X ₁₀ = R o nulo; X ₁₁ = D o nulo; X ₁₂ = A o nulo; X ₁₃ = M o nulo; X ₁₄ = D o E; X ₁₅ = Y o A;	Consenso CDR3 de HC
98	QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCSASSGVIYMYWYQQKPRSSPKPW IYLTISNLASGVPARFSGSGSGTISYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSN PLTFGAGTKLELK	VL de anti ID B-1
99	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHNYLAWYQQKQKSPQLL VYNAKTLADSVPSRFSGSGSGTQYSLKINSIQPEDFGSYYCQHFWS PYTFGGGTKLEIK	VL de anti ID B-2
100	QQWSSNPLT	CDR3 de LC de anti ID B-1
101	QQWSSNPL	CDR3 de LC de anti ID B-1
102	QHFWSPTYT	CDR3 de LC de anti ID B-2
103	QHFWSPTY	CDR3 de LC de anti ID B-2
104	SASSGVIYMY	CDR1 de LC de anti ID B-1
105	RASGNIHNYLA	CDR1 de LC de anti ID B-2
106	IYMYWY	CDR1 de LC de anti ID B-1
107	HNYLAWY	CDR1 de LC de anti ID B-2
108	LTSNLAS	CDR2 de LC de anti ID B-1
109	NAKTLAD	CDR2 de LC de anti ID B-2
110	PWIYLTSLNA	CDR2 de LC de anti ID B-1
111	LLVYNAKTLA	CDR2 de LC de anti ID B-2

(continuación)

N.º	SECUENCIA	COMENTARIO
112	X ₁ AX ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ YX ₁₀ X ₁₁ WY X ₁ = S o R; X ₃ = S o R; X ₄ = S o G; X ₅ = G o N; X ₆ = V o I; X ₇ = I o H; X ₈ = N o nulo; X ₁₀ = M o L; X ₁₁ = Y o A	Consenso CDR1 de LC
113	X ₁ X ₂ X ₃ YX ₅ X ₆ X ₇ X ₈ LAX ₁₁ X ₁ = P o L; X ₂ = W o L; X ₃ = I o V; X ₅ = L o N; X ₆ = T o A; X ₇ = S o K; X ₈ = N o T; X ₁₁ = S o D	Consenso CDR2 de LC
114	QX ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ PX ₈ T X ₂ = Q o H; X ₃ = W o F; X ₄ = S o W; X ₅ = S o W; X ₆ = N o T; X ₈ = L o Y	Consenso CDR3 de LC
115	AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSL SSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTPSSTWPSSETVTCNVAHPASSTKV DKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCVVV DISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQ DWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQM AKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSY FVYSKLVNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHTEKSLSHSPGK	CH de anti ID
116	QVQLQQPGSELVRPGGSVKLSCKASDYTFTSYWMHWVRQRPQGGL EWIGNIYPGSGGTNYDEKFKRKATLTVDTSSTAYMQLRSLTSEDSA VYYCTREVTTVAYYYSMGYWGQGTSTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGS AAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLY TLSSSVTPSSTWPSSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCIC TVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVD DVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSA AFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFP EDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVNQKSNWEA GNTFTCSVLHEGLHNHTEKSLSHSPGK	cadena pesada de anti ID
117	MGWSSIILFLVATASGVHS	secuencia señal de HC de anti ID
118	RADAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSR QNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNNYTCEATHKT STSPIVKSFNRENC	CL de anti ID
119	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQOKPDGTVKLL IYYTSRLHSGVPSRFGSGSGTDYSLTISNLEQEDATYFCQQGKTVP FTFGSGTKLEIKRADAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDI NVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERH NNYTCEATHKTSTSPIVKSFNRENC	cadena ligera de anti ID

(continuación)

N.º	SECUENCIA	COMENTARIO
120	MMSSAQFLGLLLLCFQGTRC	secuencia señal de LC de anti ID
121	AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGYSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK	CH de anti ID B-1
122	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYMKWVKQCHGKSLEWIGDINPNNGGTDYNQNFKGKATLTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCAREGNNYGSRDAMDYWGQGTSTVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGYSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK	cadena pesada de anti ID B-1
123	MGWSWIFLFLSGTAGVLS	secuencia de señal de HC de anti ID B-1
124	RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSPIVKSFNRECE	CL de anti ID B-1
125	QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCSASSGVIMYMYWYQQKPRSSPKPWLYLTSLNLAGVTPARFSGSGSTSYSLTISSMEAEDAATYCYCQWSSNPLTFGAGTKLELKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSPIVKSFNRECE	cadena ligera de anti ID B-1
126	MDFQVQIFSFLLMSASVIMSRG	secuencia señal de LC de anti ID B-1
127	AKTTPPSVYPLAPGSAQAQTNMVTGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGYSYFVYSKLNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTTEKSLSHSPGK	CH de anti ID B-2
128	QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKTSGYSFTRYWMNWVKQRPGQGLEWIGMIHPSDSETRLNQKFKDKATLTVDNSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYCASIYEEAWGQGTLTVTSAAKTTPPSVYPLAPGSAQAQTNMVTGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGYSYFVYSKLNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTTEKSLSHSPGK	cadena pesada de anti ID B-2
129	MGWSSIILFLVATATGVHS	secuencia de señal de HC de anti ID B-2
130	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHNYLAWYQQKQKGKSPQLLVYNAKTLADSVPSRFSGSGSGTQYSLKINSIQPEDFGSYCYCQHFWSYPYTFGGGTKEIK	VL de anti ID B-2

(continuación)

N.º	SECUENCIA	COMENTARIO
131	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHNYLAWYQQKQKSPQLL VYNAKTLADSVPSRFGSGSGTQYSLKINSIQPEDFGSYQCQHFWS PYTFGGGTKEIKRADAAPTIVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPK DINVWKIDGSEKQNGVLNSWTDQDSKSTYSMSSTLTTLTKDEYER HNSYTCEATHKTSPIVKSFNREK	cadena ligera de anti ID B-2
132	MSVLTQVLALLLWLTGARC	secuencia señal de LC de anti ID B-2
133	ESKYGPPCPPCP	espaciador (bisagra de IgG4) (aa) de <i>Homo sapiens</i>
134	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCTGCCCCCTTGCCCT	espaciador (bisagra de IgG4) (nt) de <i>Homo sapiens</i>
135	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK	Espaciador bisagra-CH3 de <i>Homo sapiens</i>
136	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK	Espaciador bisagra-CH2-CH3 de <i>Homo sapiens</i>
137	RWPESPKAQASSVPTAQPAEGLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKK EKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCF VVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHNSGSQSQHSRLTLP RSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAQAPVKLSLNLASS DPPEAASWLLCEVSGFSPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPG STTFWAWSVLRVAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSIV TDH	IgD-bisagra-Fc de <i>Homo sapiens</i>
138	FWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (aminoácidos 153-179 del N.º de registro P10747) de <i>Homo sapiens</i>
139	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKP FWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (aminoácidos 114-179 del N.º de registro P10747) de <i>Homo sapiens</i>
140	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28 (aminoácidos 180-220 de P10747) de <i>Homo sapiens</i>
141	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28 (de LL a GG) de <i>Homo sapiens</i>
142	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCEL	4-1BB (aminoácidos 214-255 de Q07011.1) de <i>Homo sapiens</i>
143	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGL YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 zeta de <i>Homo sapiens</i>
144	RVKFSRSAEPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGL YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 zeta de <i>Homo sapiens</i>
145	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGL YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 zeta de <i>Homo sapiens</i>
146	LEGGGEGRSLLTCGDVEENPGPR	T2A artificial

(continuación)

N.º	SECUENCIA	COMENTARIO
147	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNIGIGIGEFKDSLSINATNIKHFK NCTISISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQA WPENRTDLHAFENLEIIRGRKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEIS DGDVHISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQ VCHALCSPEGCGWPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFV ENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPA GVMGENNTLVWKYADAGHVC HLCHPNCTYGCTGPGLEGCP TNGP KIPSIATGMV GALLLLL VVALGIGLFM	tEGFR artificial
148	RKVCNIGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTISISGDLHILPVAFRGDSFT HTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRK QHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVHISGNKNLCYANTINWKK LFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCGWPEPRDCVSC RNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTG RGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPA GVMGENNTLVWKYADAGHVC HLCHPNCTYGCTGPGLEGCP TNGPKIPSIATGMV GALLLLL VVALGI GLFM	tEGFR artificial
149	EGRGSLLTCGDVEENPGP	T2A artificial
150	PLGLWA	Enlazador escindible de MMP
151	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
152	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
153	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
154	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* o *ex vivo* para expandir células, que comprende incubar una composición de entrada, comprendiendo dicha composición de entrada células que expresan un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular que se une específicamente o reconoce un antígeno, con una pluralidad de partículas que son o comprenden perlas, en donde la pluralidad de partículas comprende un diámetro medio de entre o entre aproximadamente 2 μm y 5 μm y tienen unida una molécula de unión que se une específicamente a o reconoce el dominio de unión a antígeno, en donde:
 - el antígeno es CD19;
 - la molécula de unión es un anticuerpo antiidiotipo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente al dominio de unión a antígeno; y
 - la unión de la molécula de unión al dominio de unión a antígeno induce la expansión de las células que comprenden el receptor de antígeno quimérico, produciendo de este modo una composición de salida que comprende células expandidas.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la molécula de unión no se une ni reconoce una región enlazadora o espaciadora del receptor de antígeno quimérico, conectando dicha región enlazadora o espaciadora el dominio de unión a antígeno con el dominio transmembrana del receptor de antígeno.
3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el dominio de unión a antígeno del receptor de antígeno quimérico es o comprende:
 - (a) el anticuerpo SJ25C1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo; o
 - (b) el anticuerpo FMC63 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
4. El método de la reivindicación 3, en donde el fragmento de unión a antígeno es o comprende un scFv.
5. El método de la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en donde el anticuerpo antiidiotipo o fragmento de unión a antígeno del mismo:
 - (a) comprende al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina, opcionalmente una región Fc o una porción del Fc que comprende los dominios CH2 y CH3; y/o
 - (b) es un anticuerpo inalterado o un anticuerpo de longitud completa.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la molécula de unión está:
 - (a) unida a la partícula en o cerca del residuo de aminoácidos en el extremo C de la molécula de unión;
 - (b) unida covalentemente a las partículas; y/o
 - (c) unida covalentemente a la partícula a través de un grupo funcional expuesto en la superficie, opcionalmente en donde, el grupo funcional expuesto en la superficie es un grupo amino, un grupo carboxilo, un grupo tiol, un grupo aldehído, un grupo clorometilo, un grupo epoxi, un grupo hidroxilo, un grupo tosilo o un grupo hidrazina, opcionalmente en donde el grupo funcional expuesto en la superficie es un grupo tosilo.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la partícula:
 - (a) es una partícula sintética, una partícula insoluble, una partícula sólida o una partícula no celular;
 - (b) tiene un diámetro de, o de aproximadamente 2,8 μm o 4,5 μm ;
 - (c) es o comprende vidrio, sílice, poliésteres de ácidos hidroxicarboxílicos, polianhídridos de ácidos dicarboxílicos, copolímeros de ácidos hidroxicarboxílicos, copolímeros de ácidos dicarboxílicos o un metal;
 - (d) comprende una superficie que comprende un polímero, un polisacárido, una sílice, un ácido graso, un carbono o una combinación de los mismos, opcionalmente en donde el polímero es polietilenglicol, poli(ácido láctico-co-glicólico), poliglutaraldehído, poliuretano, poliestireno y alcohol polivinílico o combinaciones de los mismos;
 - (e) comprende una superficie hidrófoba;
 - (f) comprende una superficie de poliestireno;
 - (g) es magnética y/o comprende un núcleo magnético, un núcleo paramagnético o un núcleo superparamagnético; y/o
 - (h) comprende al menos o aproximadamente al menos 10 copias, 10^2 copias, 10^3 copias, 10^4 copias, 10^5 copias o 10^6 copias de la molécula de unión.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la partícula comprende además al menos un agente unido a la superficie de la partícula, en donde el al menos un agente se une específicamente a una molécula adicional en una célula para proporcionar una señal accesoria y/o para bloquear una señal inhibidora, opcionalmente en donde el al menos un agente es un ligando o es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo y/o en donde el al menos un agente está unido covalentemente a la partícula.

9. El método de la reivindicación 8, en donde la molécula adicional es:
- (a) una molécula coestimuladora o un correceptor activador, opcionalmente OX-40, ICOS, DAP10, B7-1, B7-2, CD28 o 4-1BB; o
 - 5 (b) un receptor inhibidor, opcionalmente CTLA-4, PD-1, LAG-3, Tim-3, BTLA o TIGIT.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 8-9, en donde la relación, opcionalmente la relación molar o en peso, de la molécula de unión y el al menos un agente comprendido por la partícula es o es aproximadamente 1:1.
- 10 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde:
- la concentración de la molécula de unión en la composición está entre o entre aproximadamente 0,5 µg/ml y 500 µg/ml, 1 µg/ml y 200 µg/ml o 5 µg/ml y 100 µg/ml; o
 - 15 la concentración de la molécula de unión en la composición es de al menos o al menos aproximadamente 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml o 200 µg/ml.
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde la pluralidad de partículas es monodispersa.
- 20 13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde las células son linfocitos T que expresan el receptor de antígeno quimérico, opcionalmente en donde los linfocitos T son poblaciones de linfocitos T completas, células CD4+, células CD8+ y/o subpoblaciones de los mismos.
14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde:
- 25 la incubación se realiza durante más de o más de aproximadamente 2 horas, 4 horas, 8 horas, 12 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días o 12 días; y/o
 - la incubación se realiza a una temperatura de entre o entre aproximadamente 30 °C y 39 °C, opcionalmente en donde la incubación se realiza a una temperatura de 37 °C ± 2,0 °C.

FIG. 1

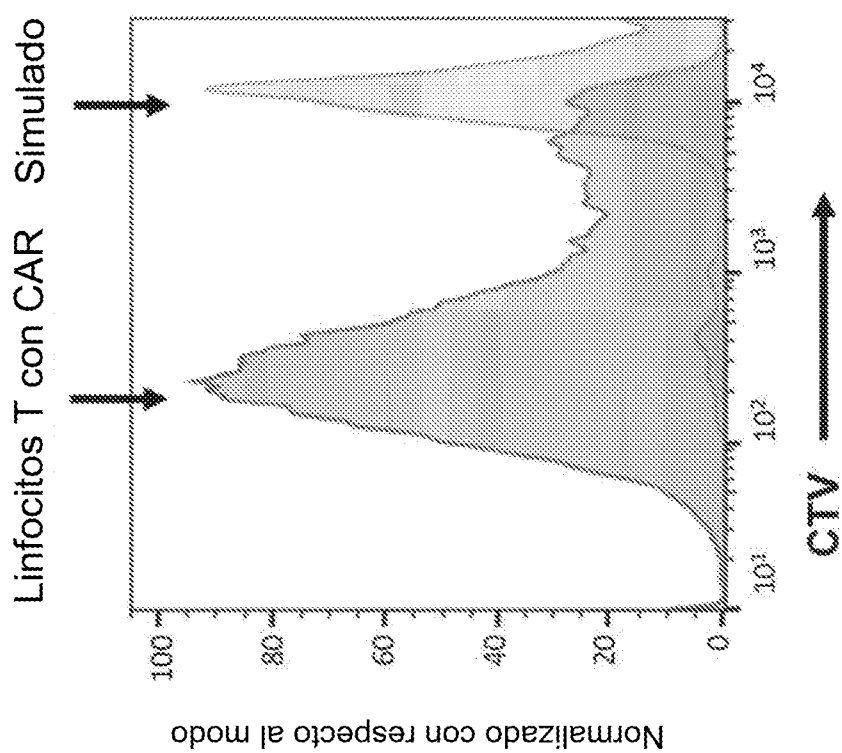


FIG. 2A

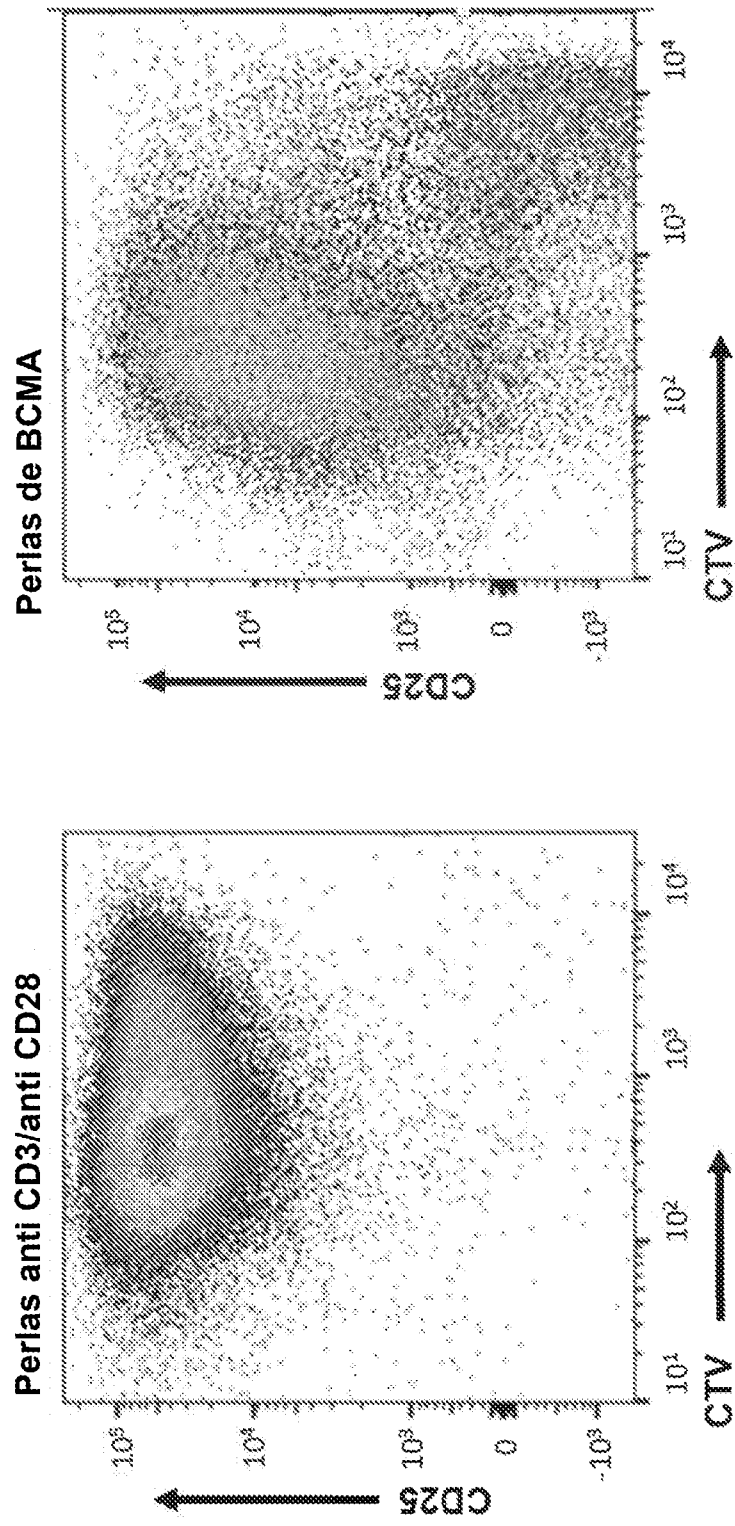


FIG. 2B

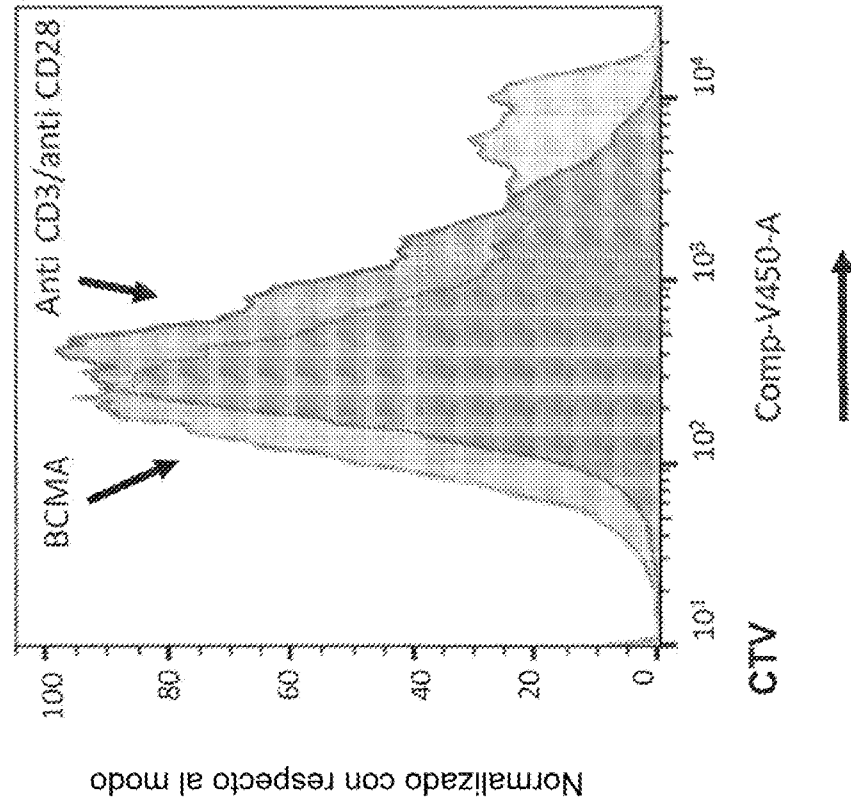


FIG. 2C

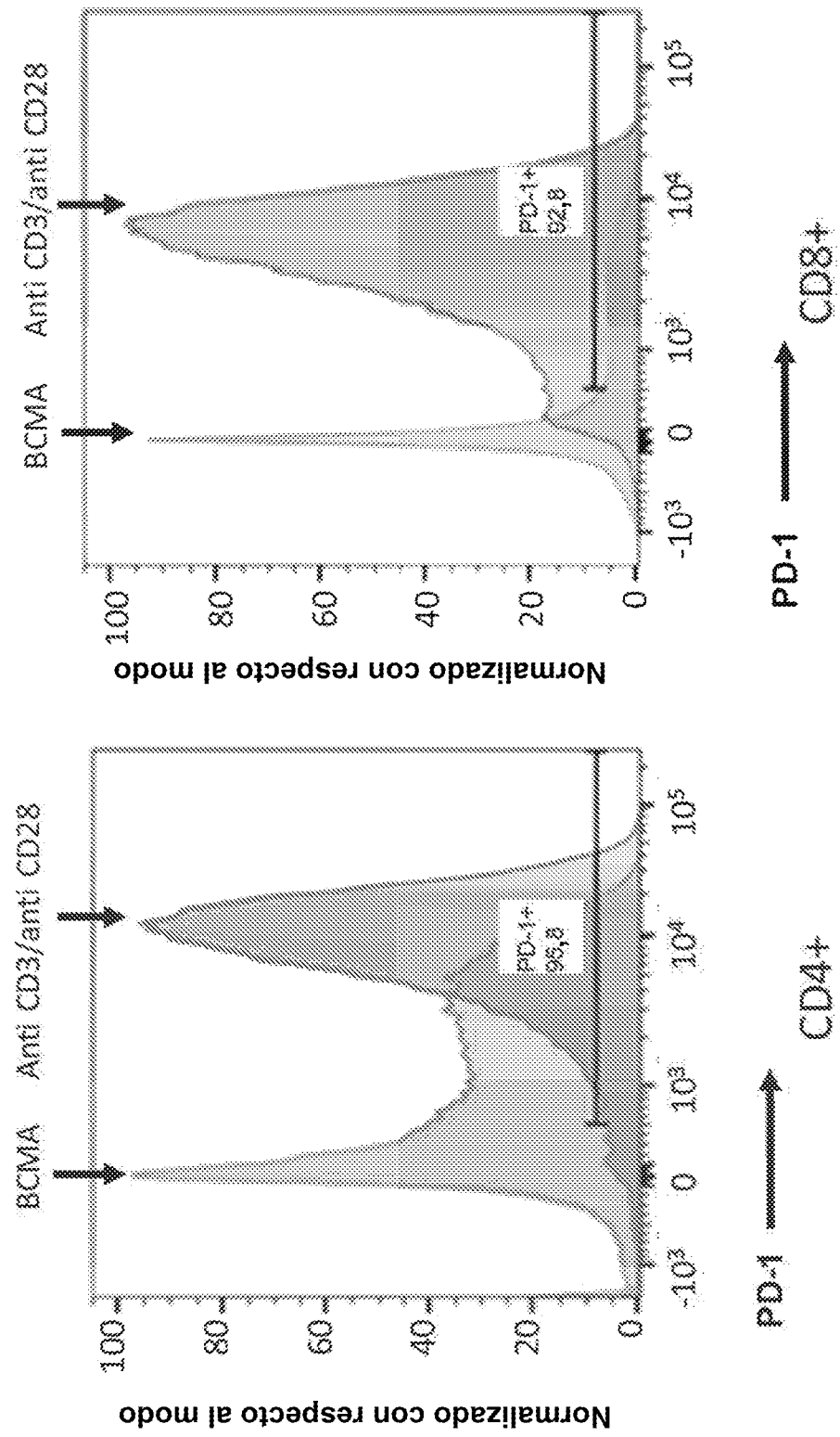


FIG. 3A

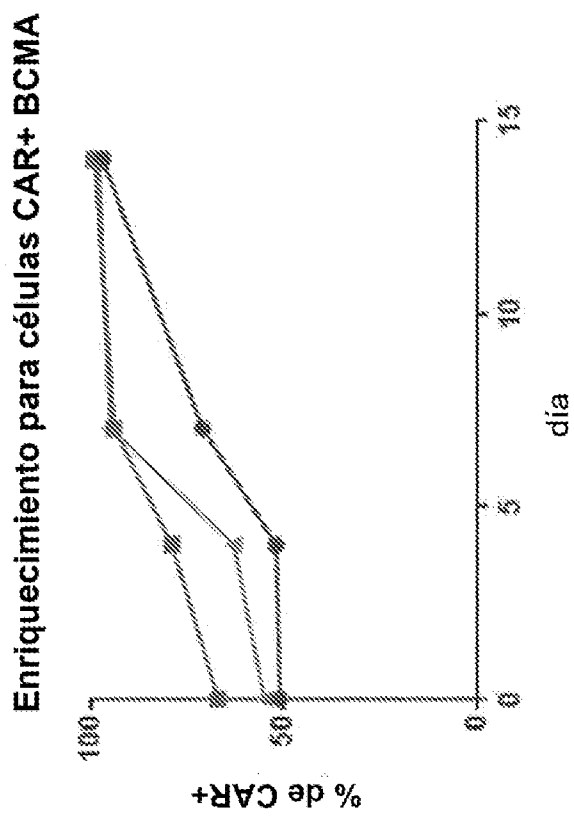


FIG. 3B

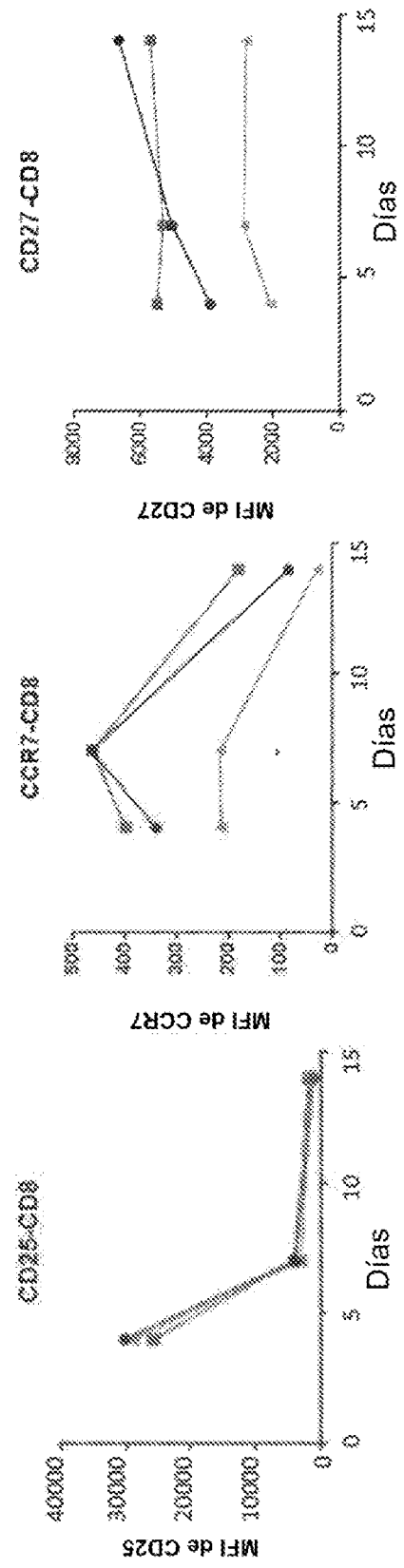


FIG. 4A

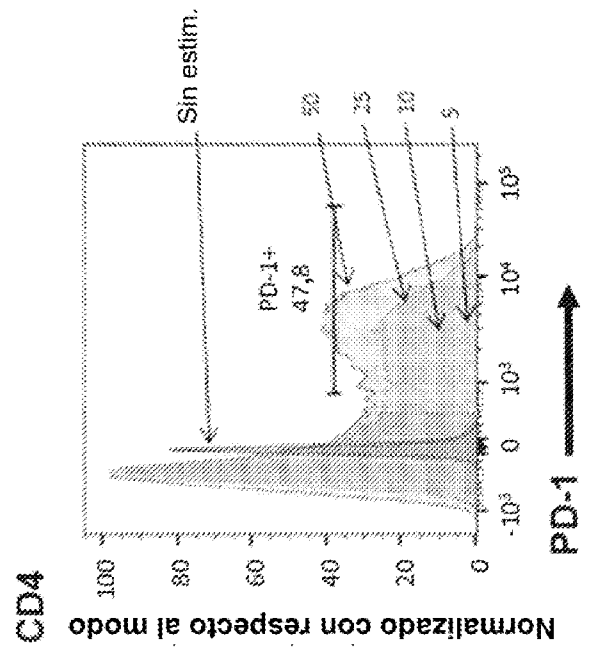
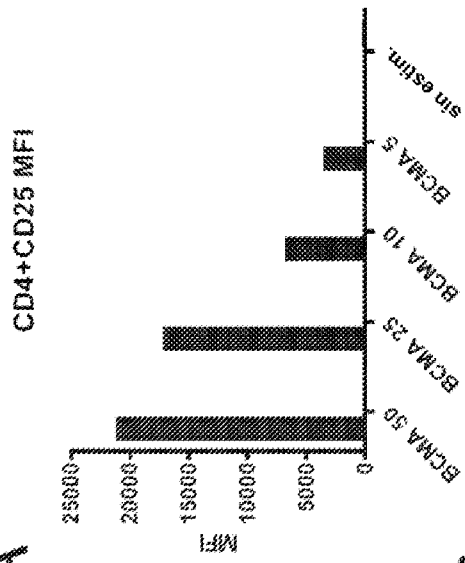
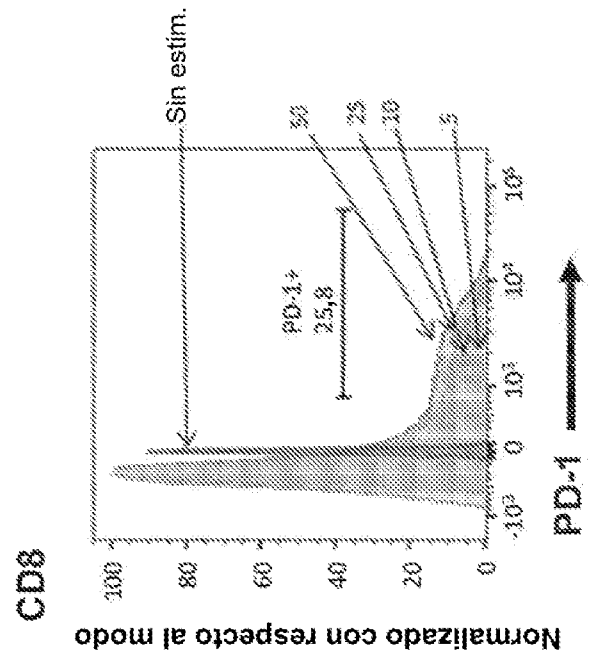
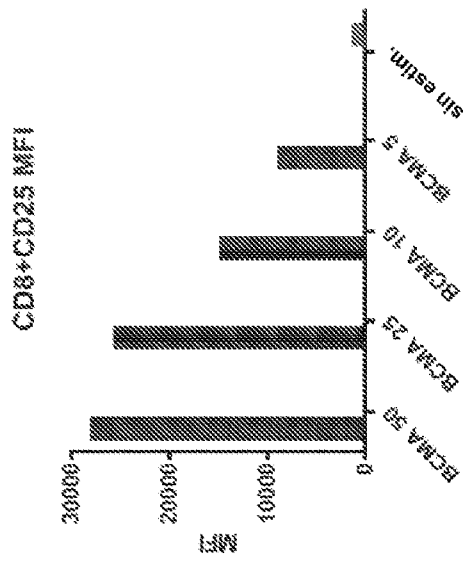


FIG. 4B

FIG. 5A

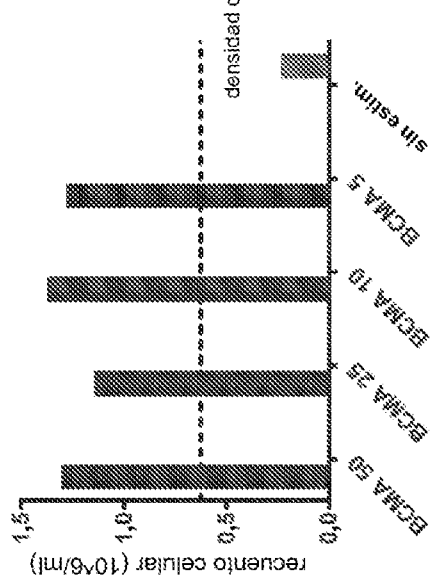


FIG. 5B

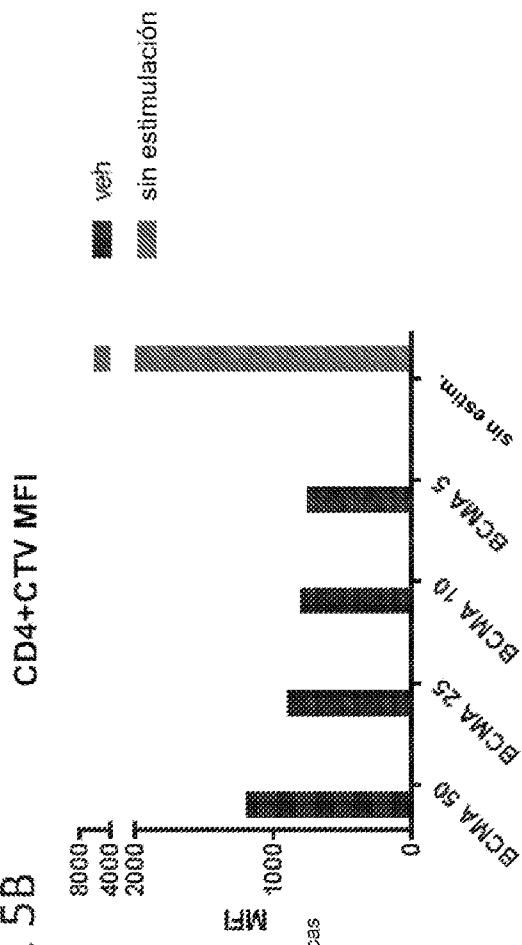


FIG. 6

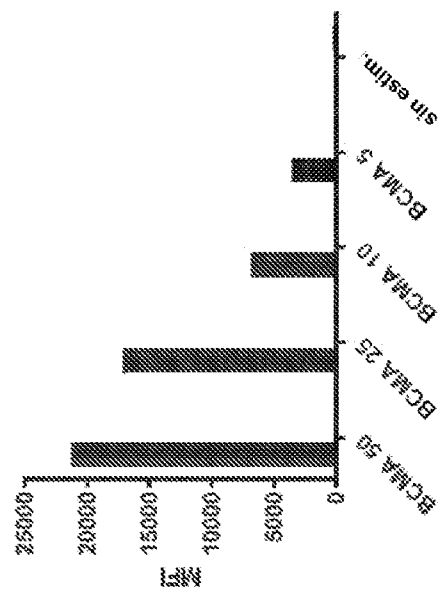


FIG. 7A

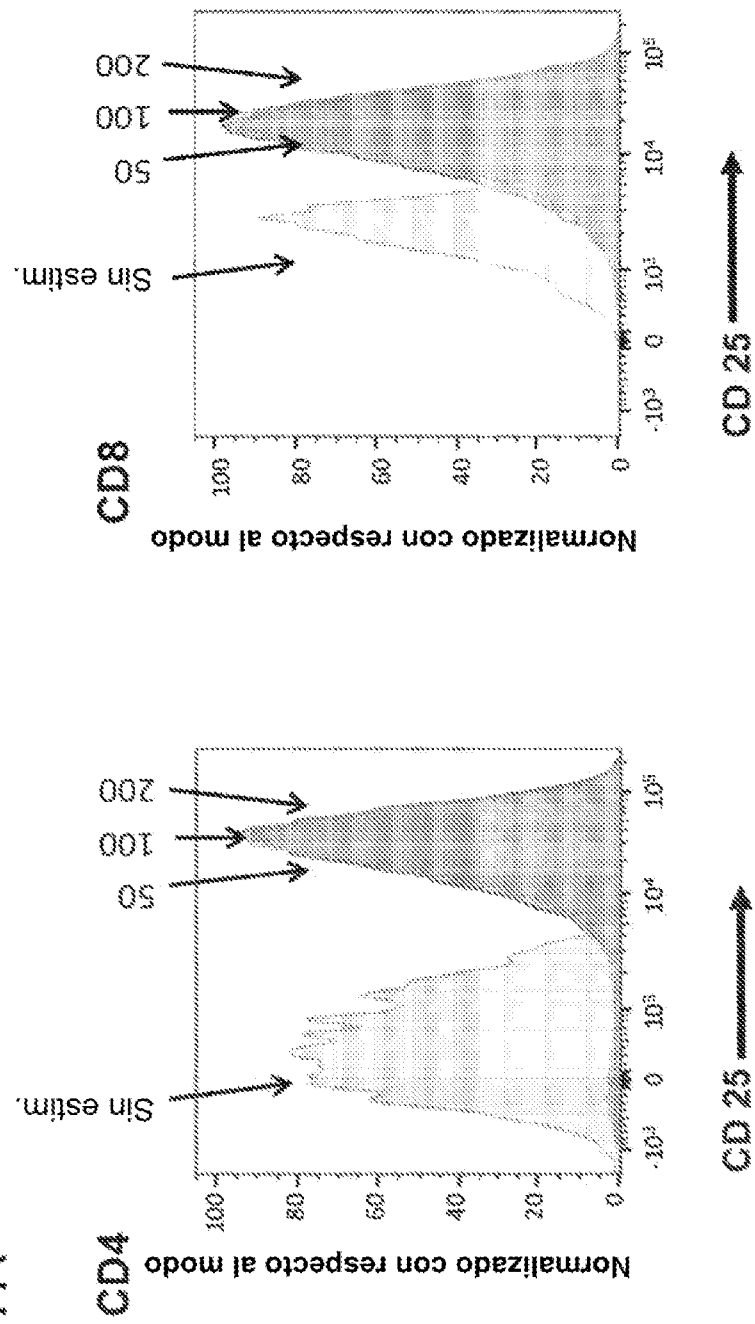


FIG. 7B

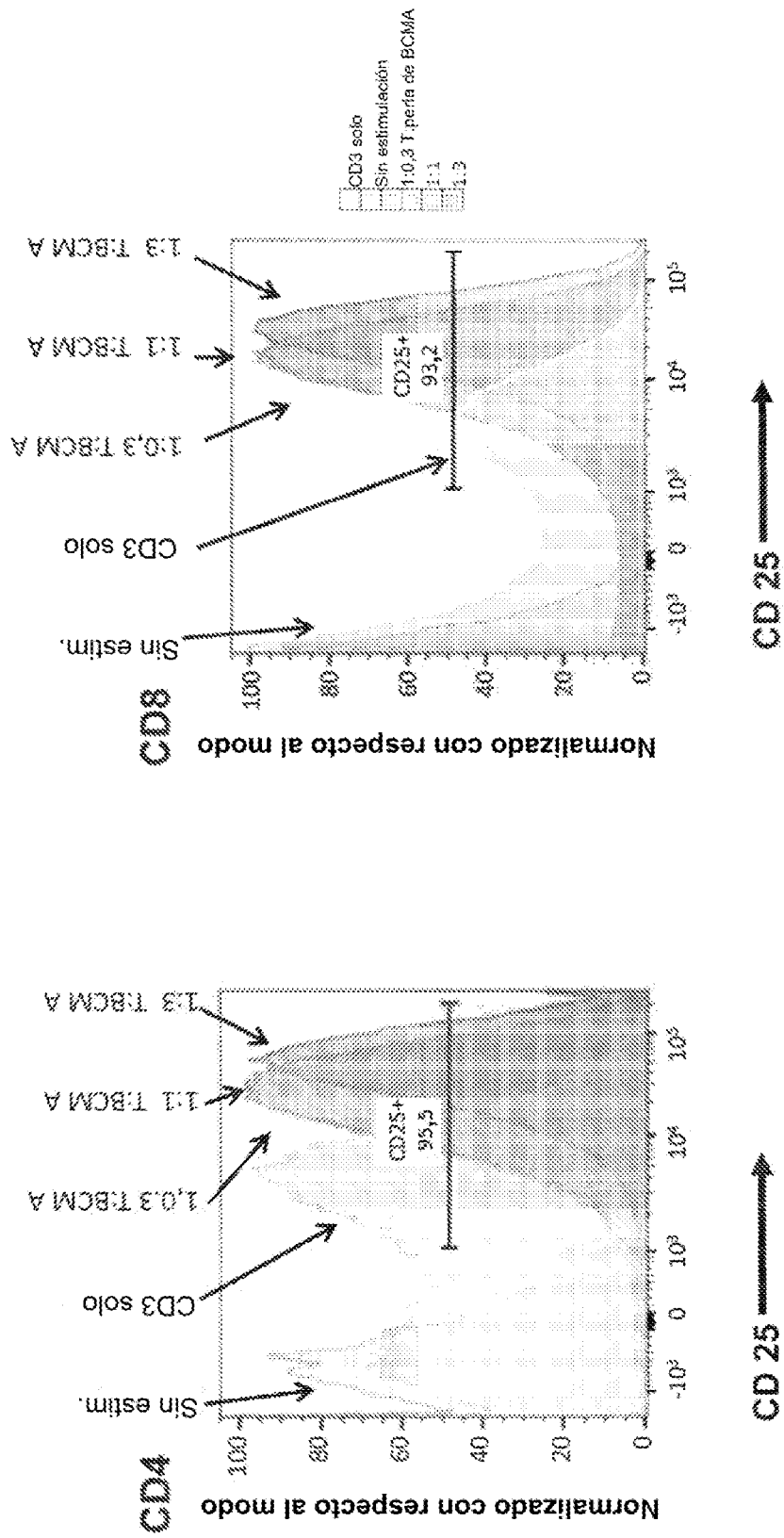


FIG. 7C

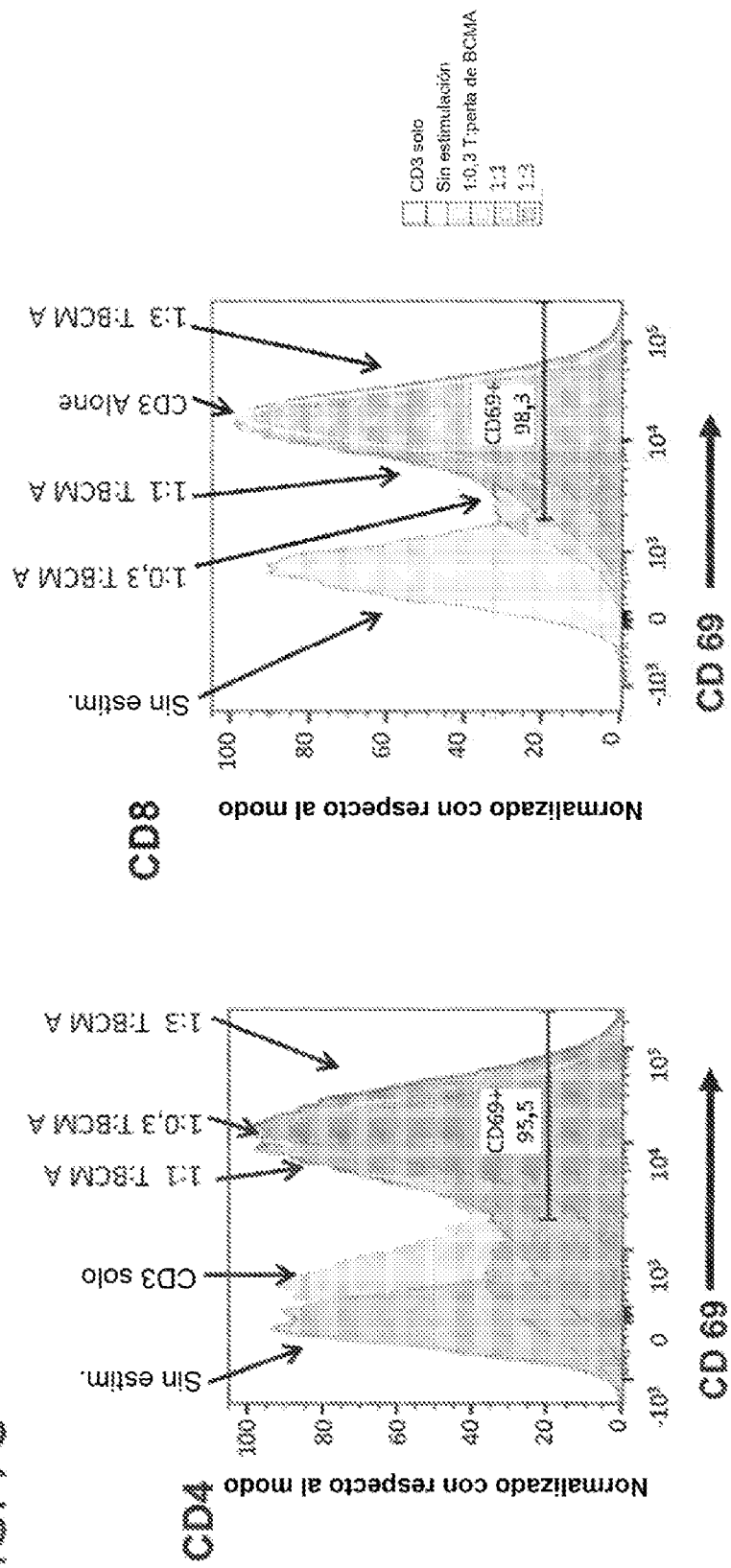
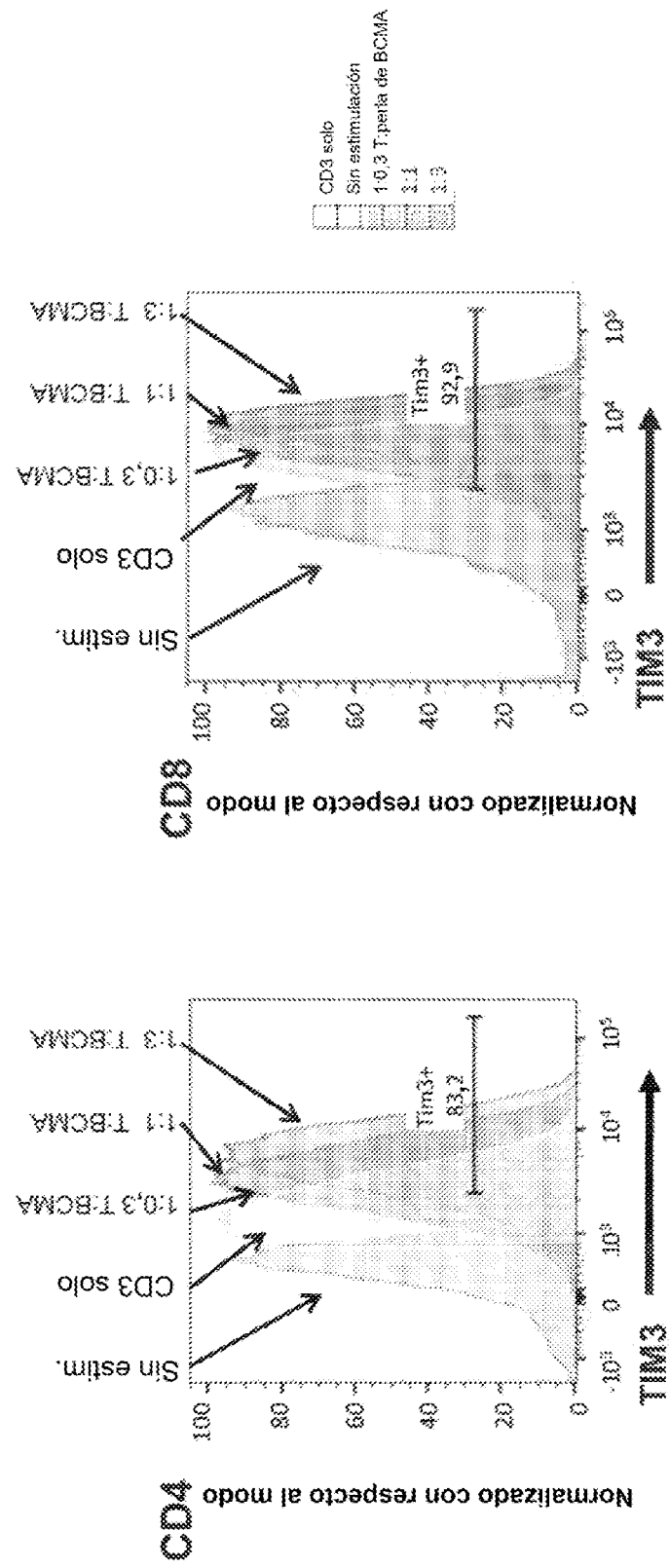
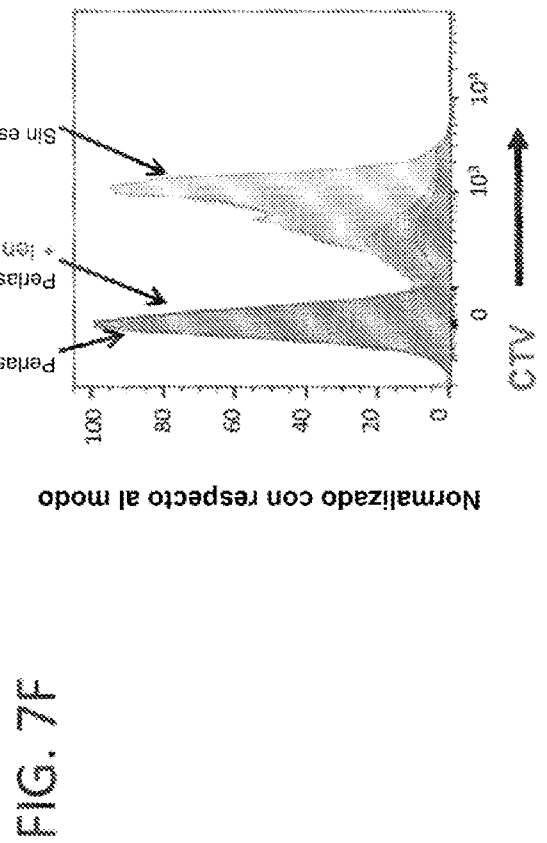
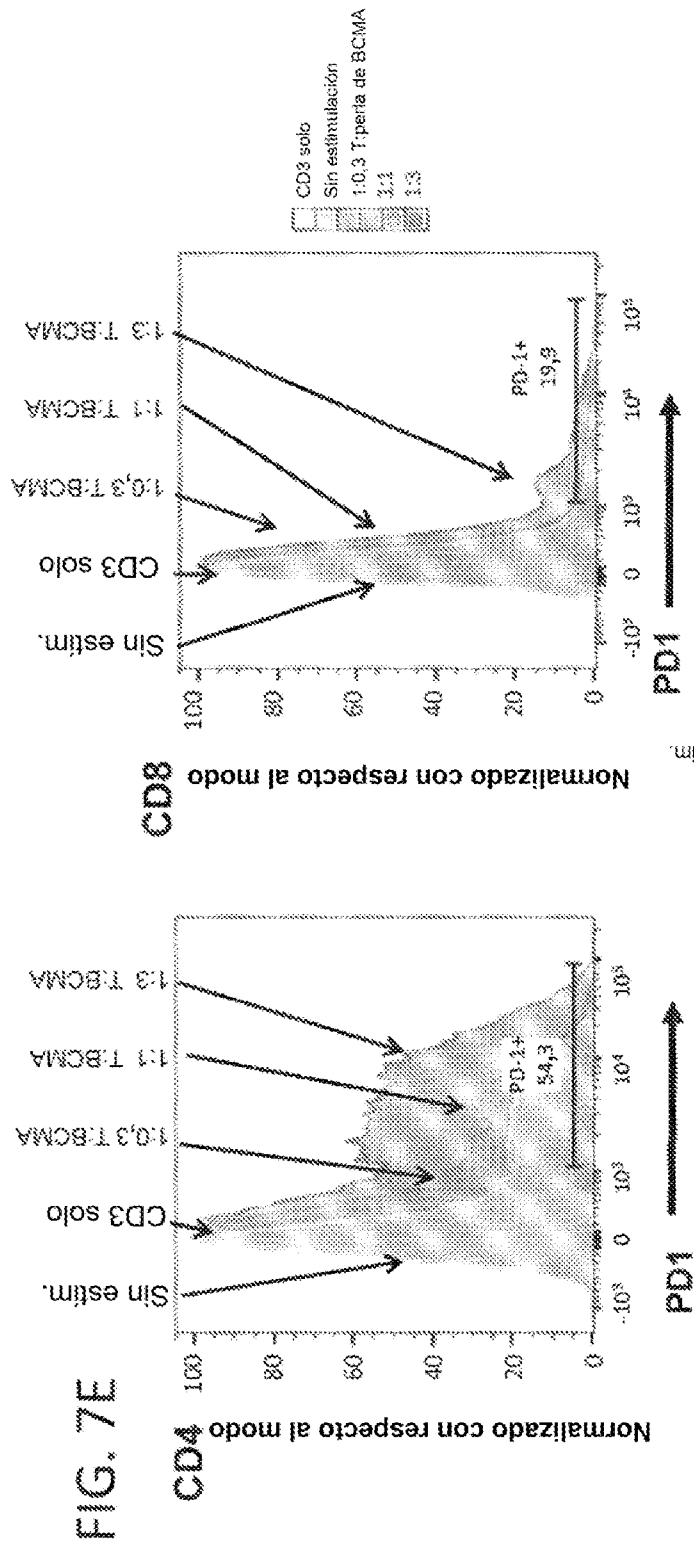


FIG. 7D





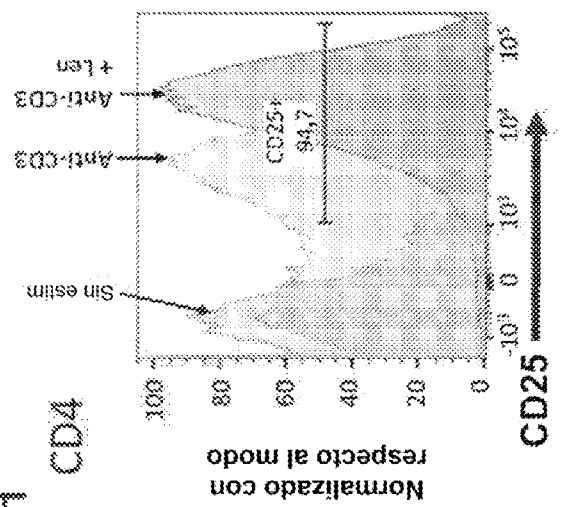
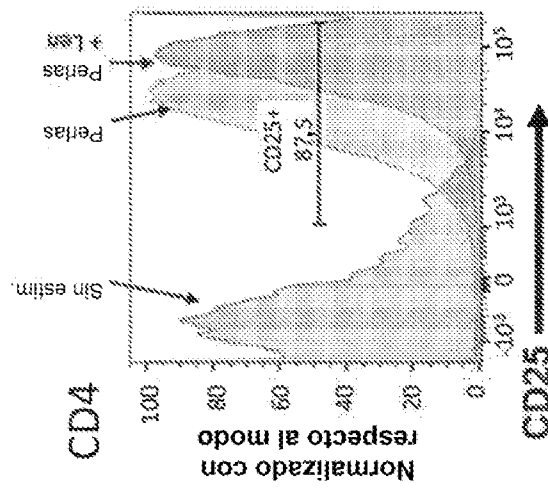
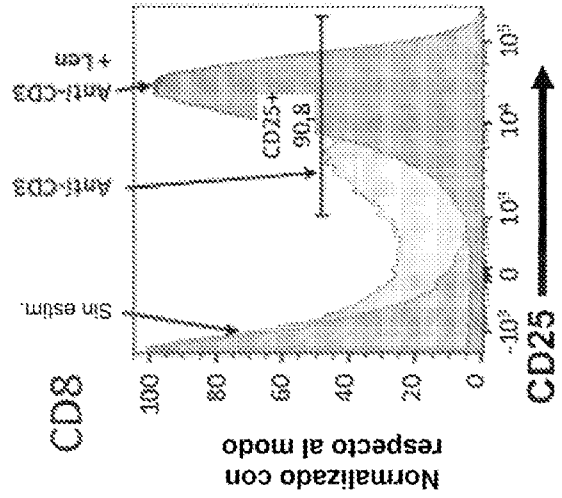
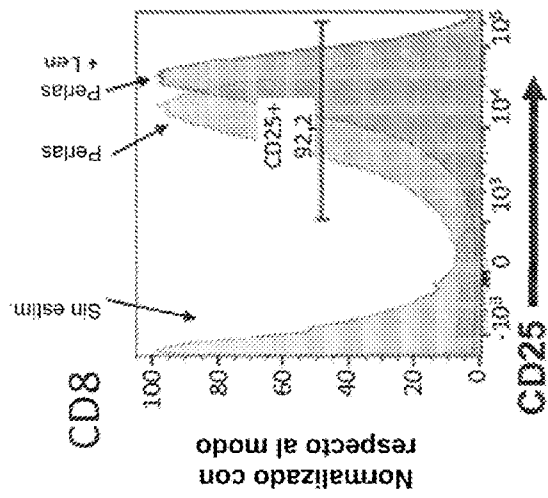


FIG. 7G

FIG. 7H

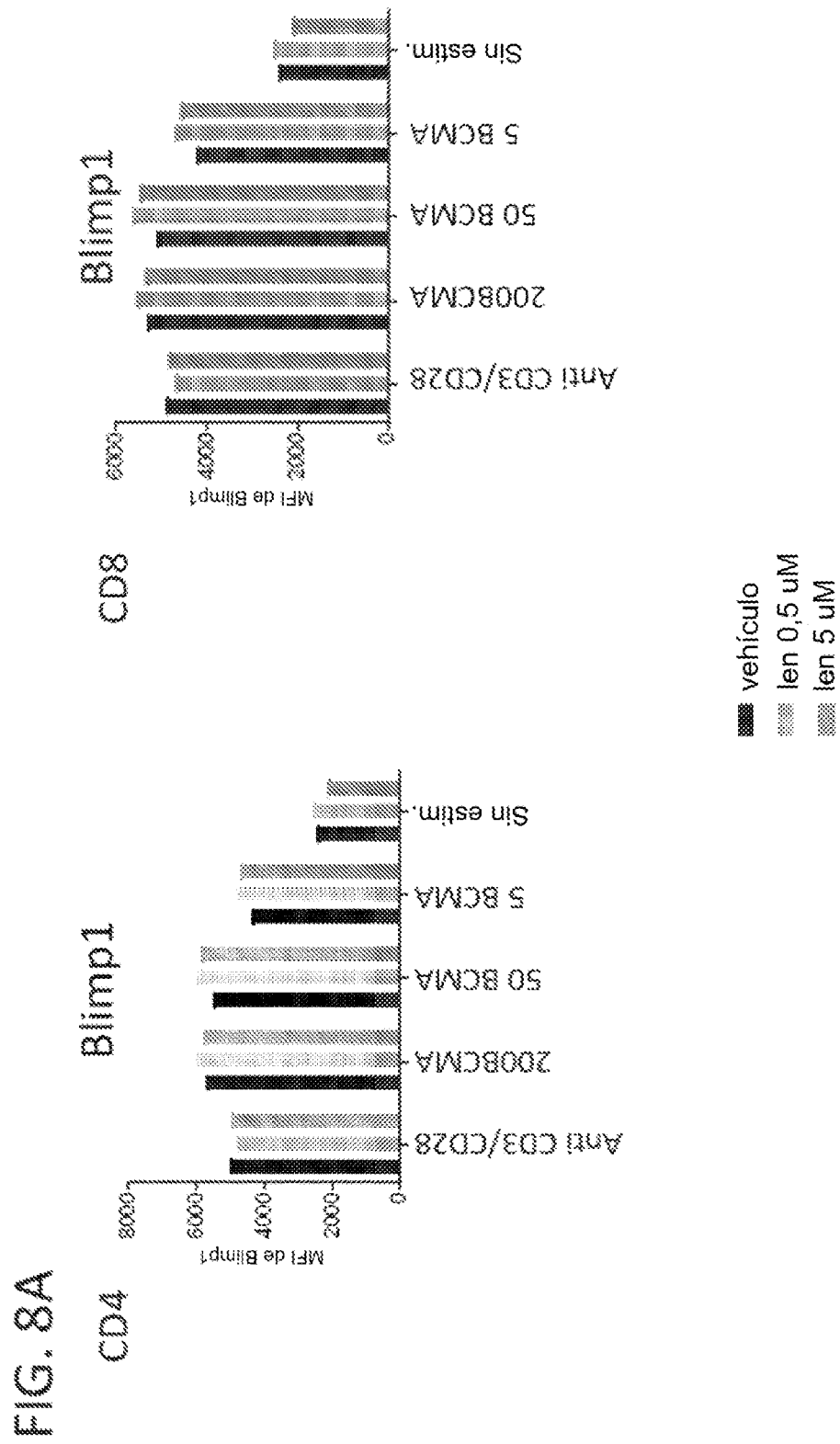


FIG. 8B

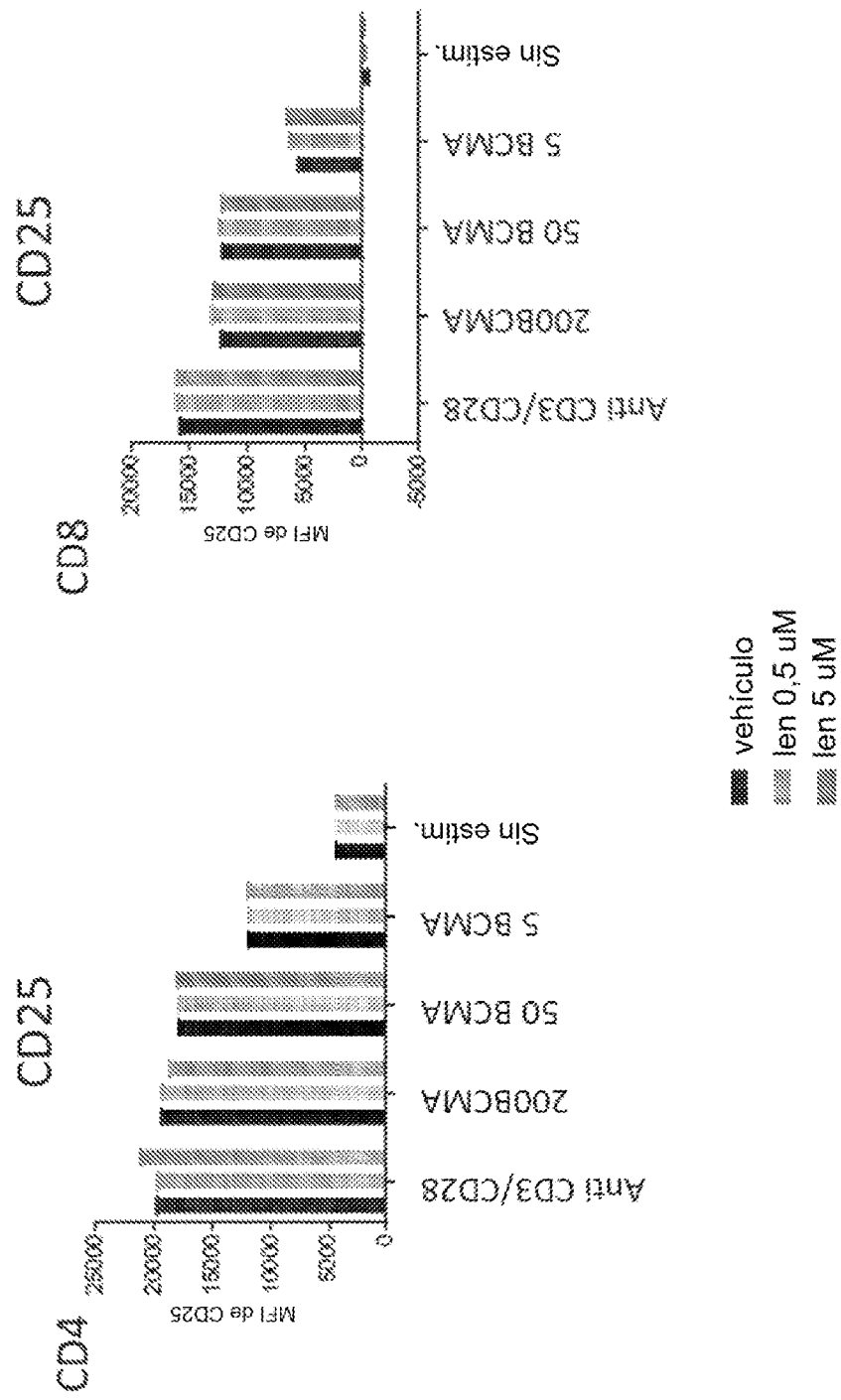


FIG. 8C

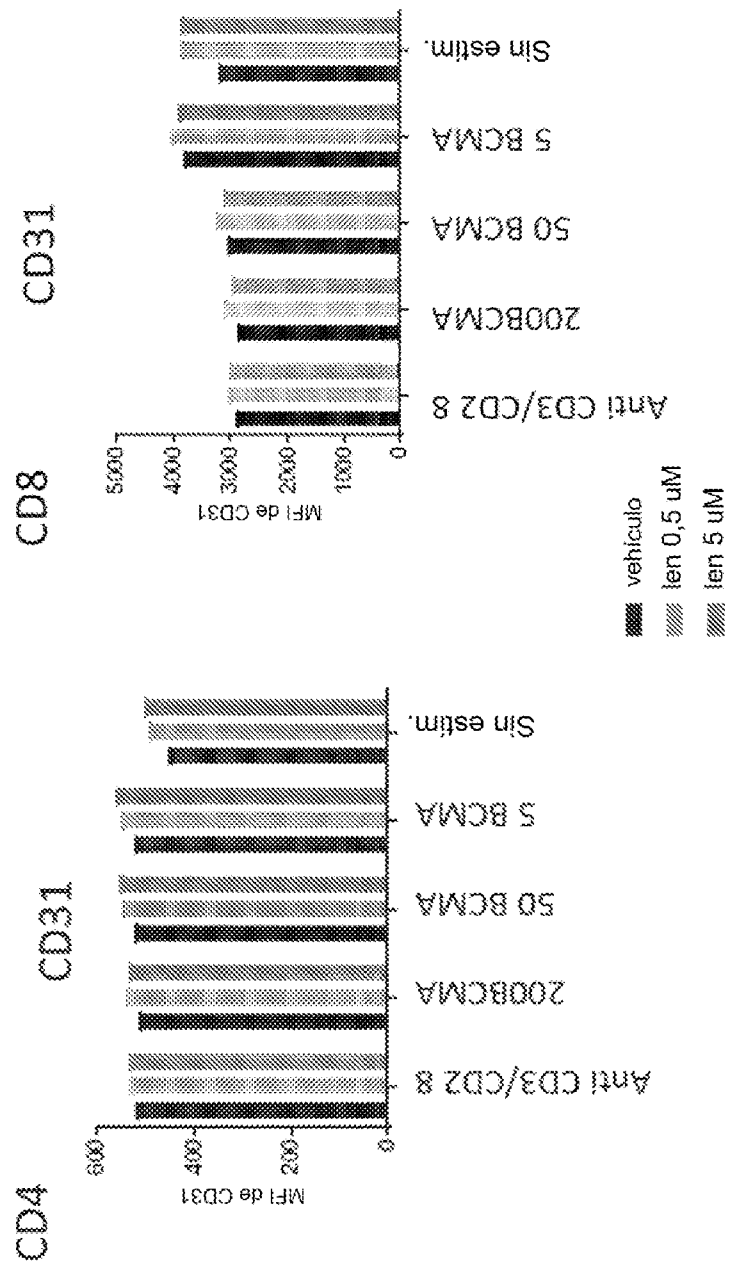


FIG. 8D

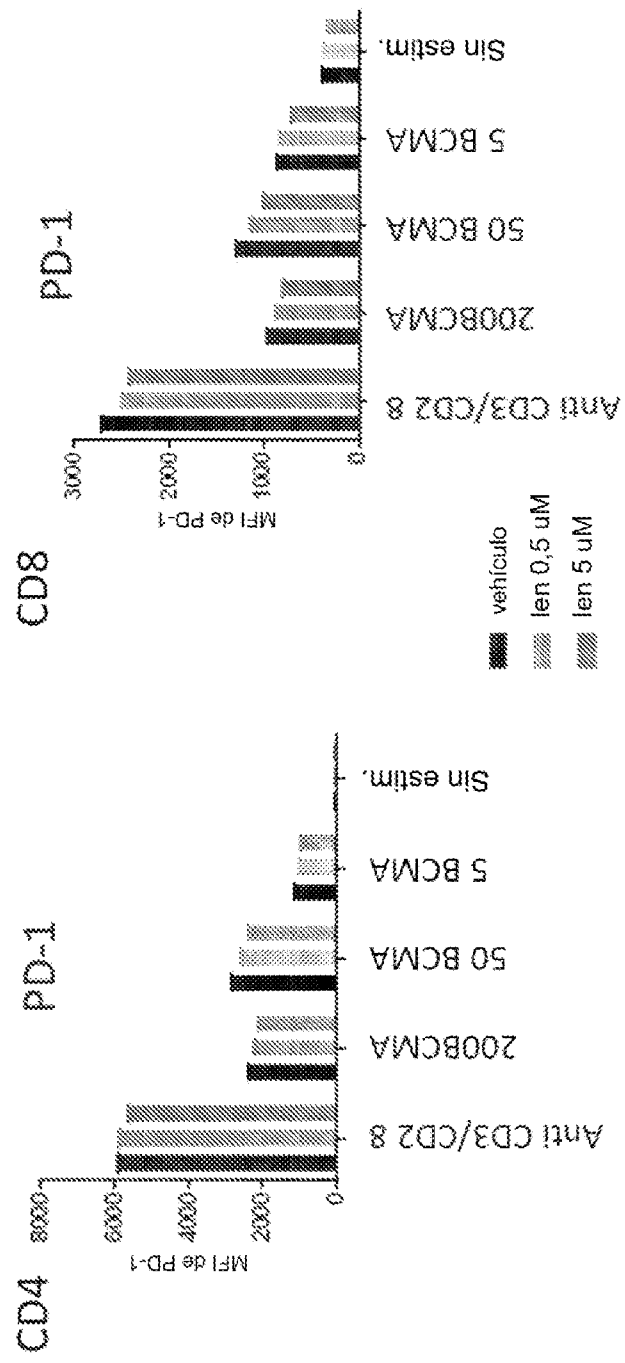


FIG. 8E

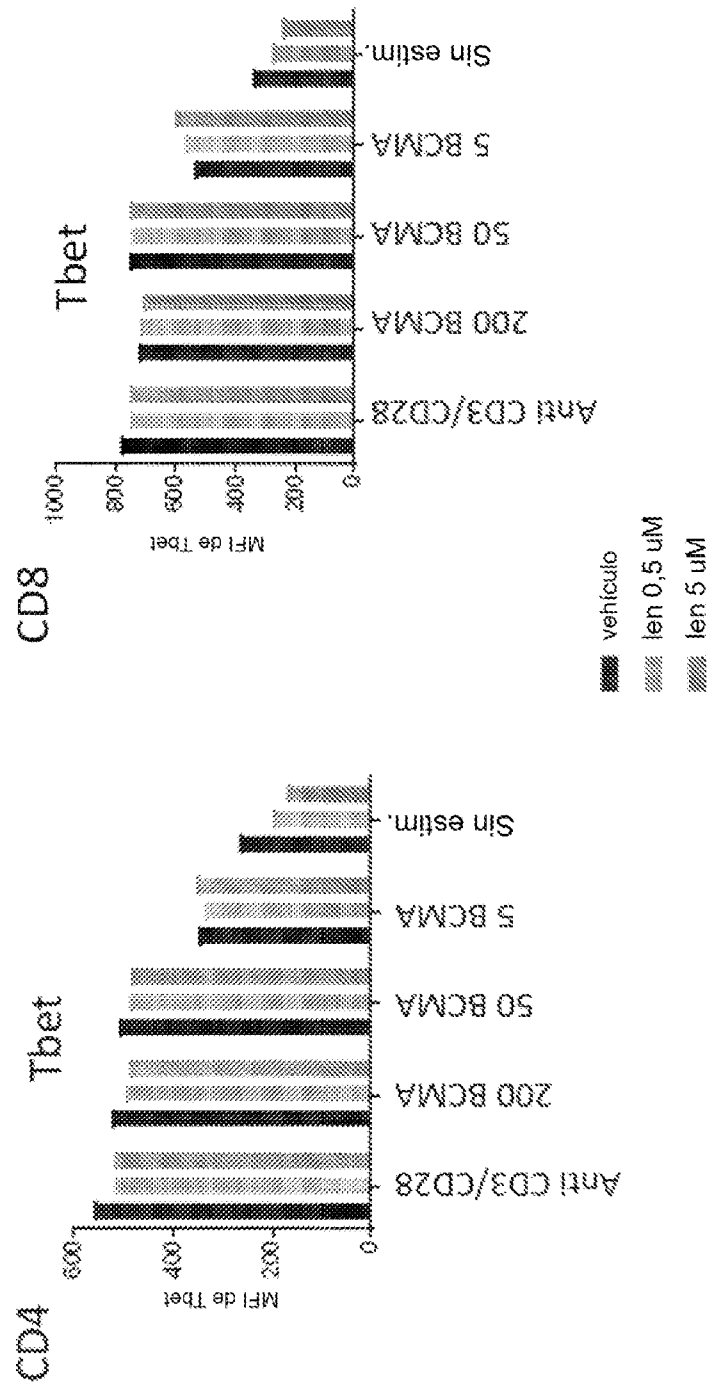


FIG. 8F

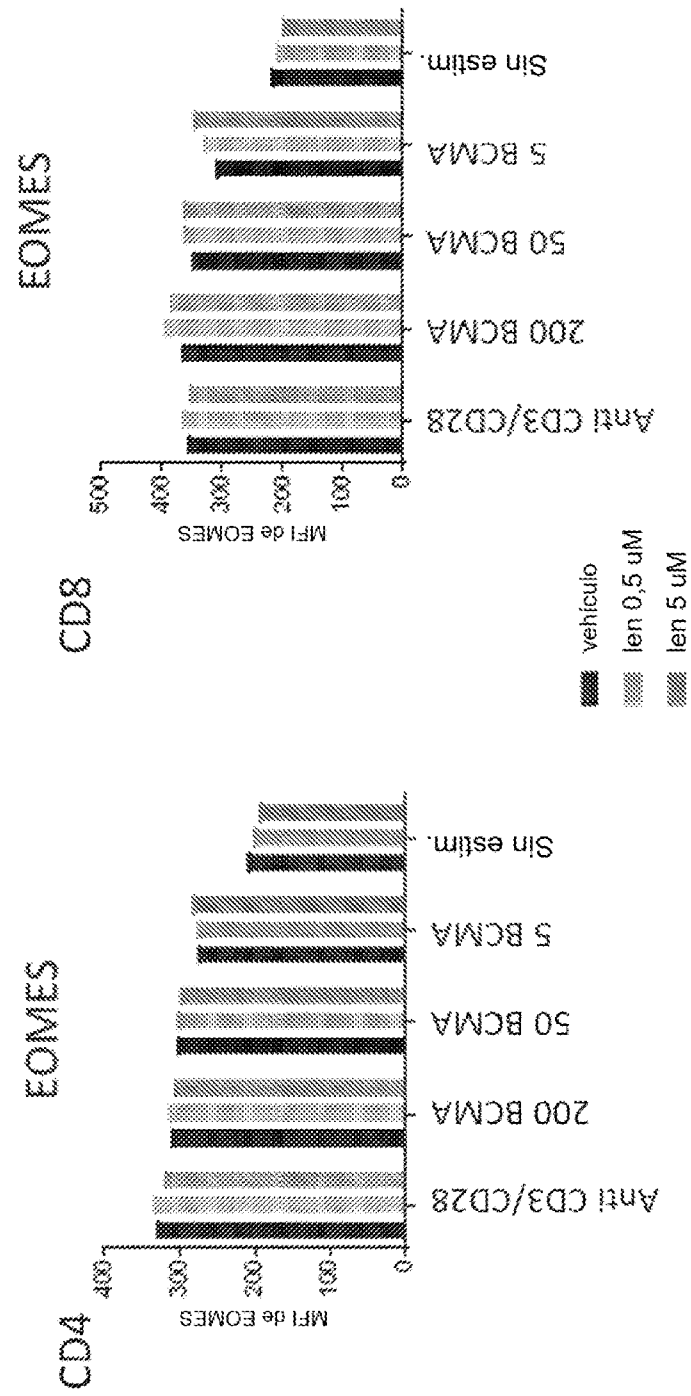
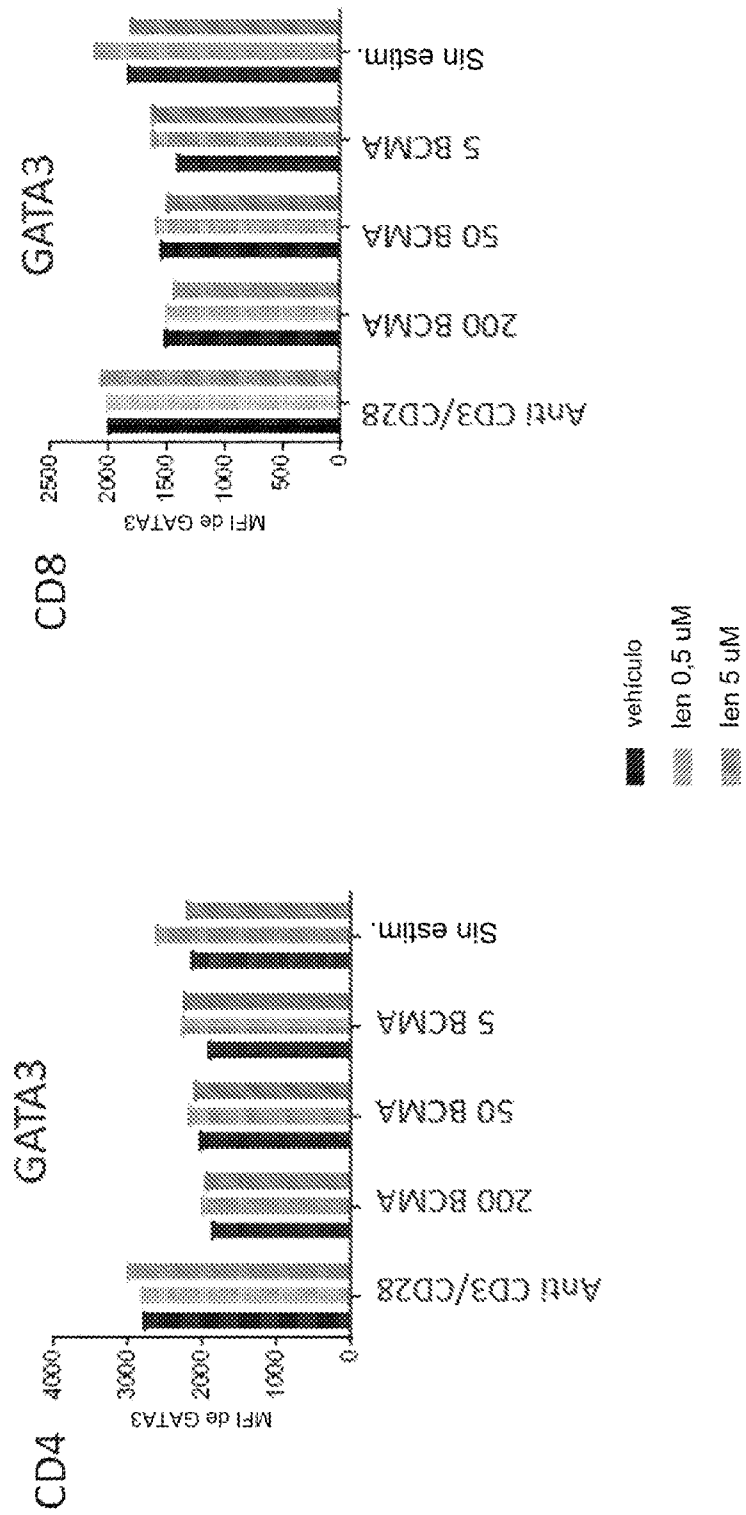


FIG. 8G



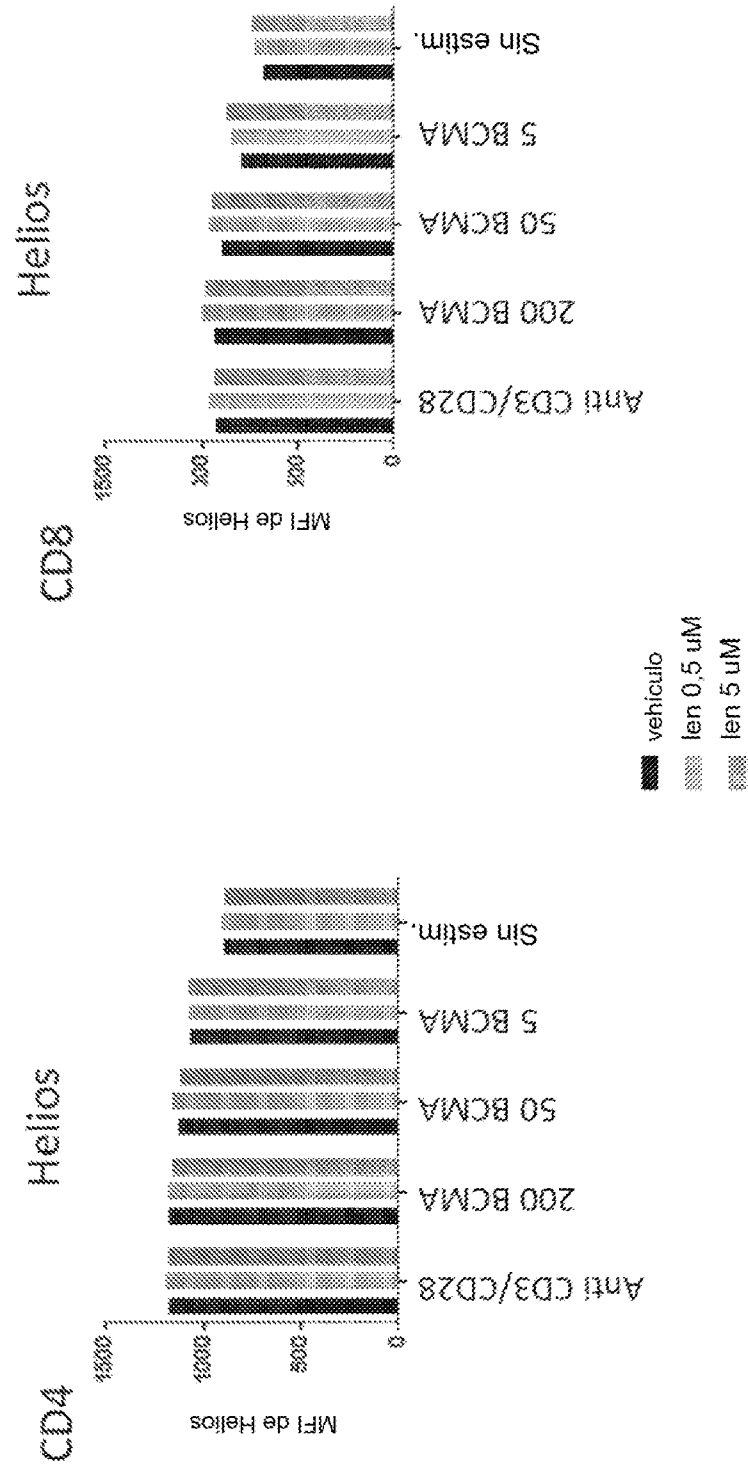


FIG. 8H

FIG. 8I

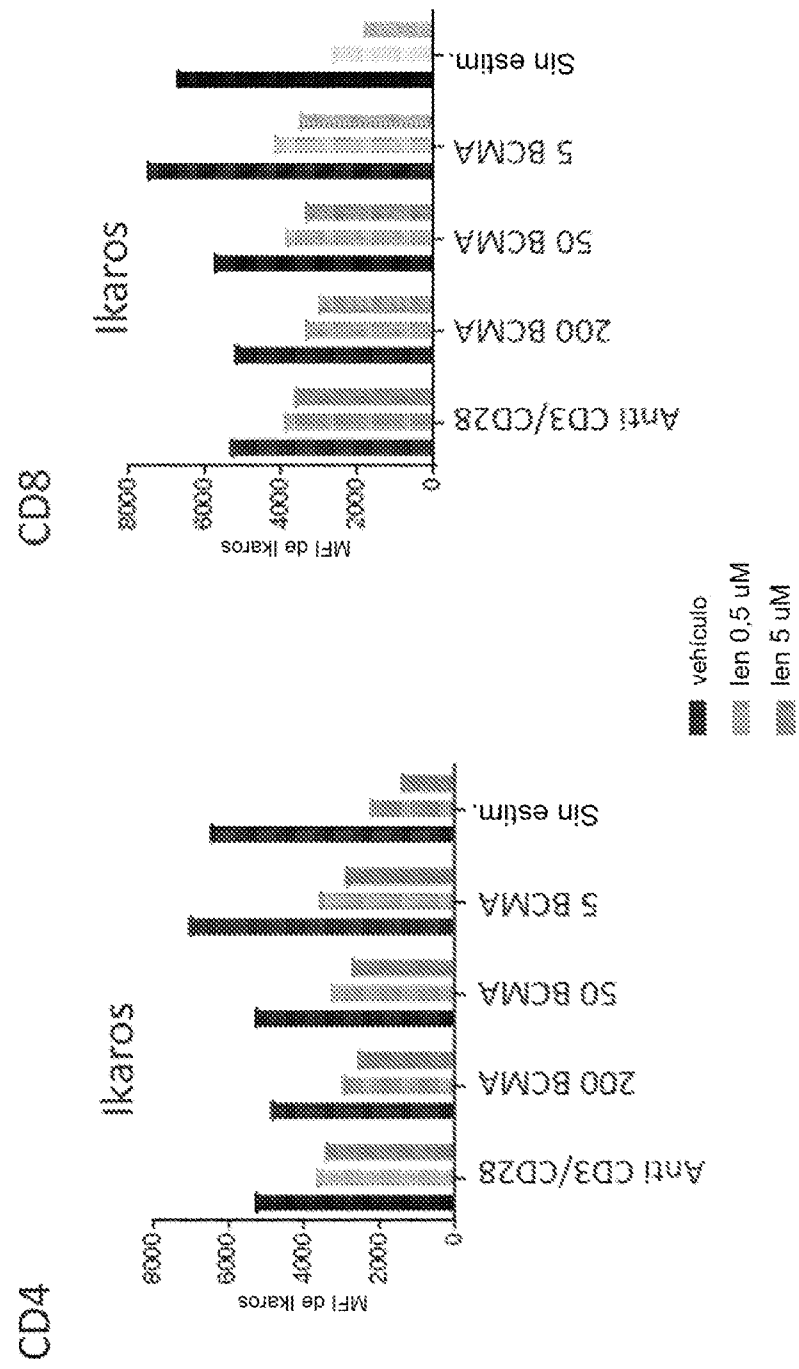


FIG. 9A

Secreción de IFN γ

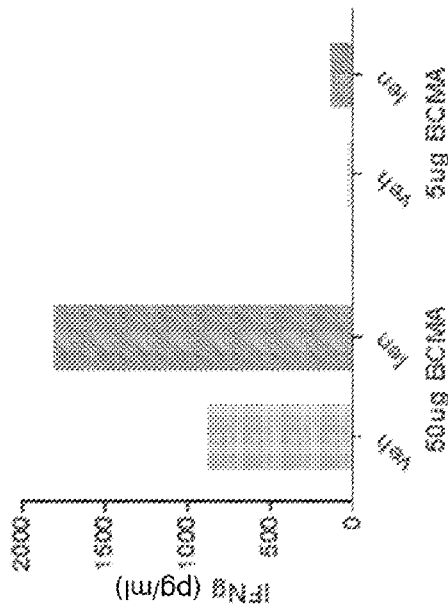


FIG. 9B

Secreción de IL-2

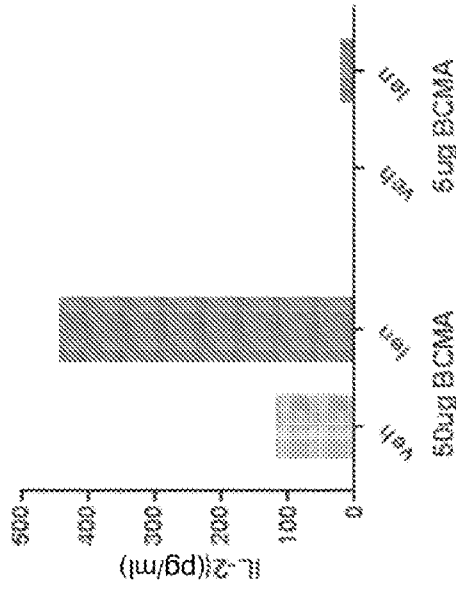


FIG. 9C

Secreción de TNF α

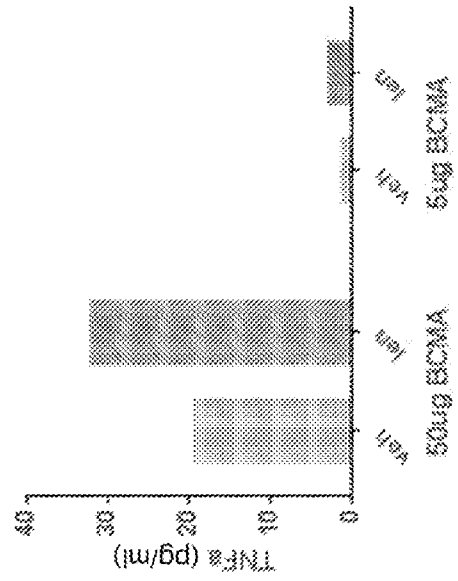


FIG. 9D

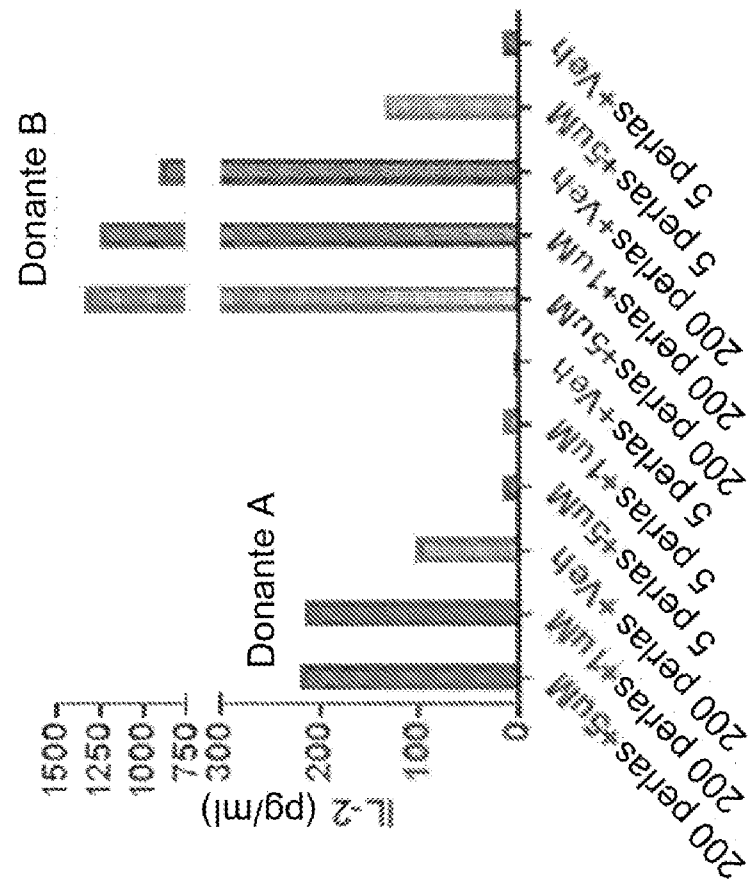


FIG. 9E

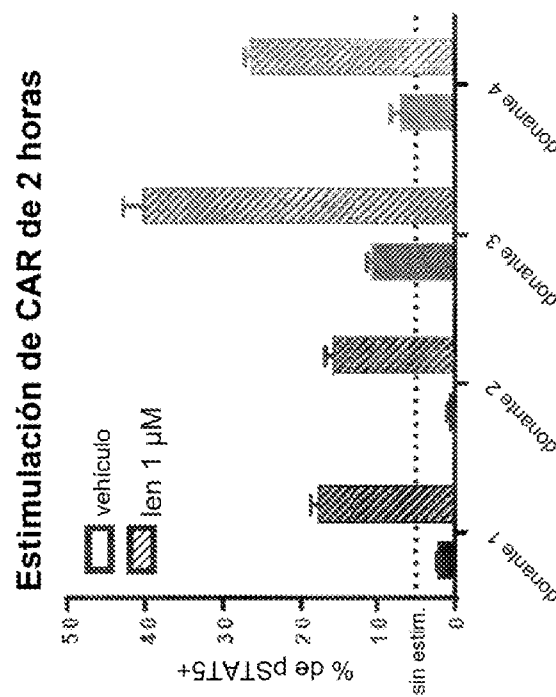
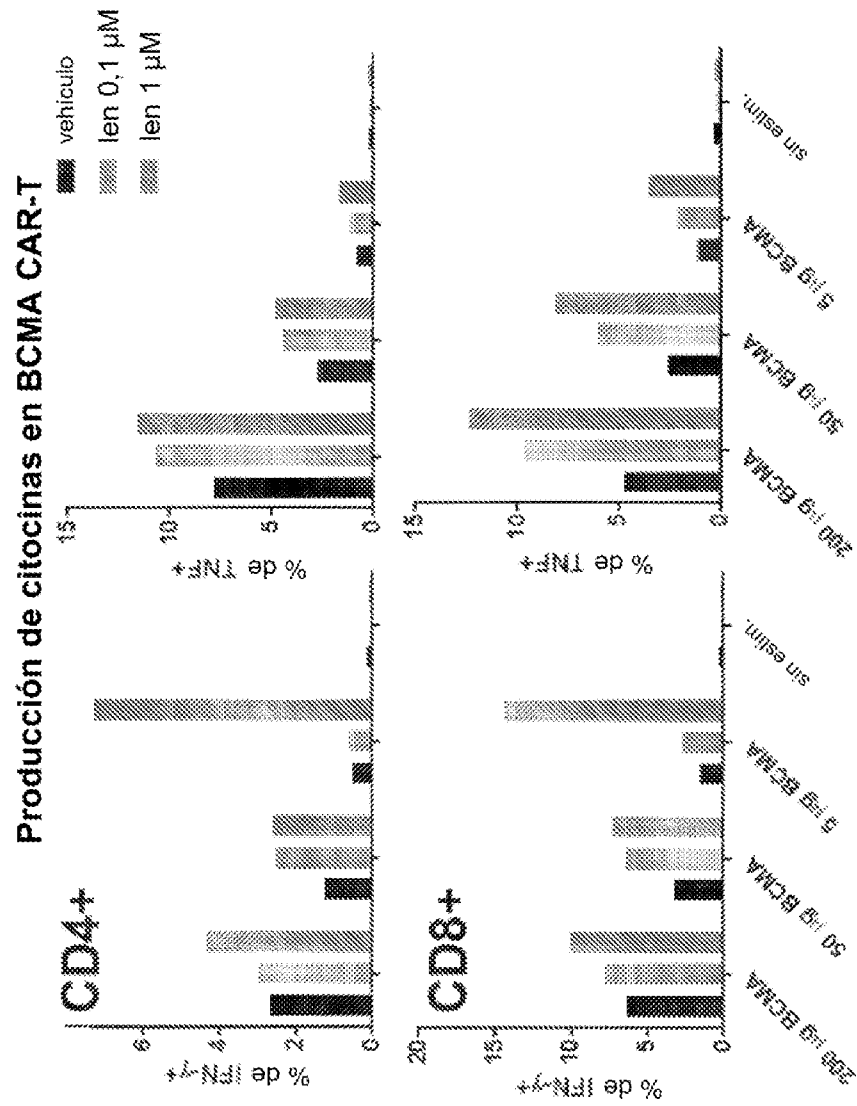


FIG. 9F



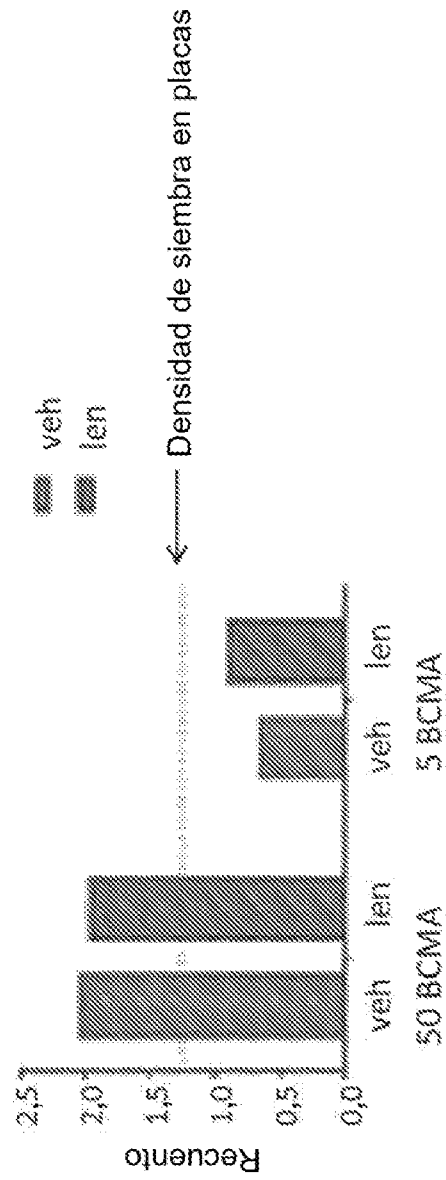


FIG. 9G

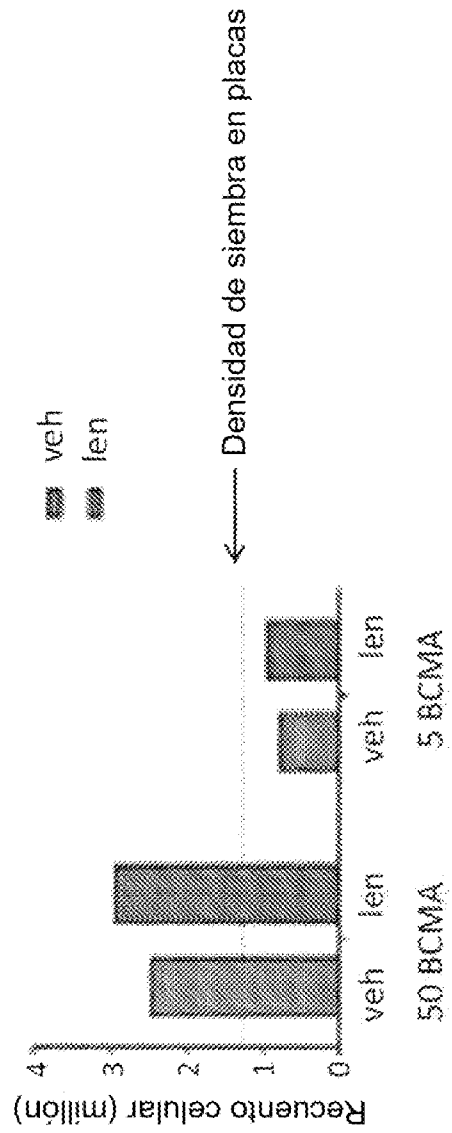
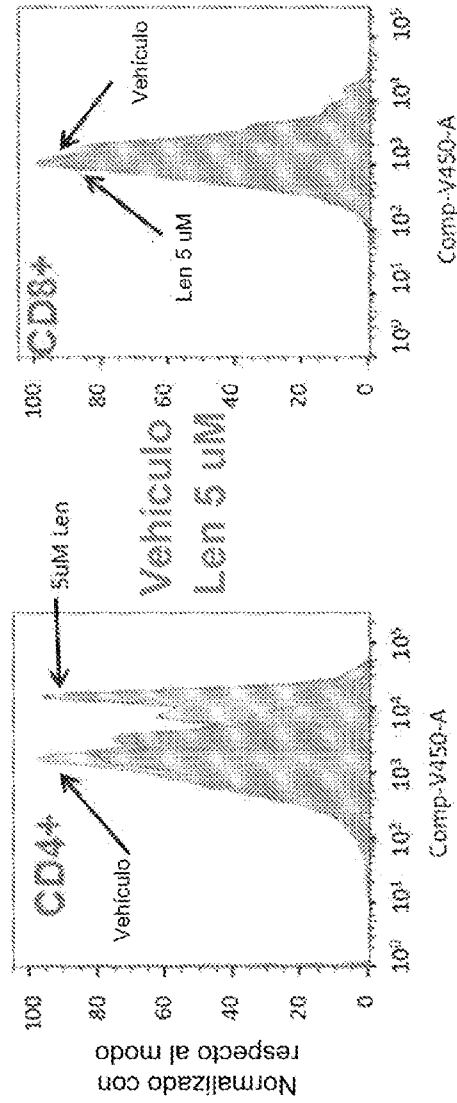


FIG. 9H

FIG. 9I

Ensayo de dilución de colorante Cell Trace Violet

Día 4 en cultivo



Día 7 en cultivo

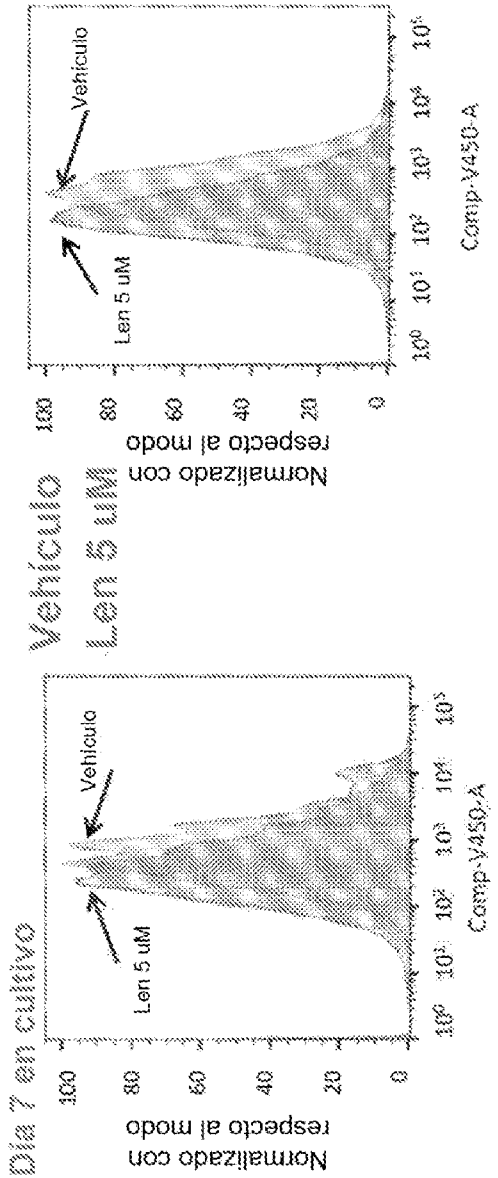


FIG. 9J

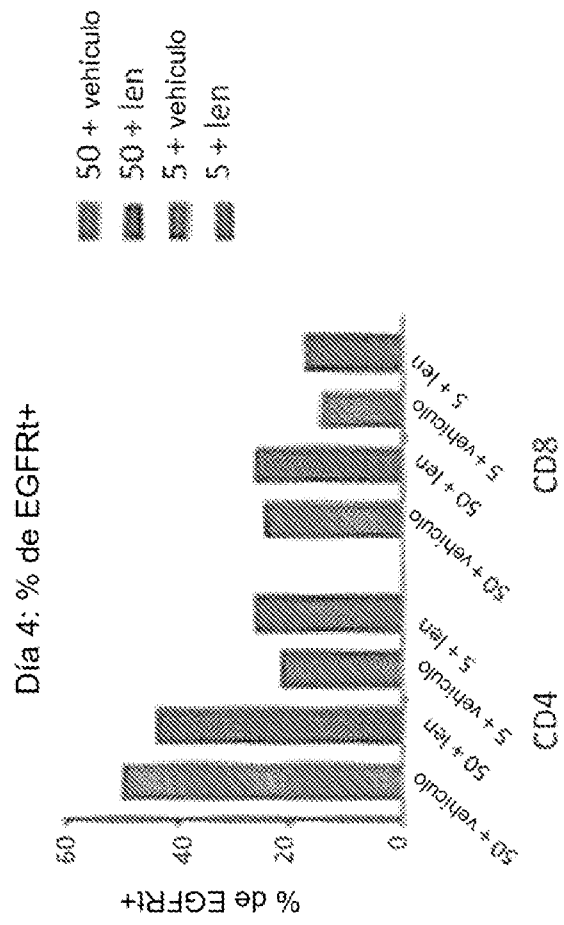


FIG. 9K

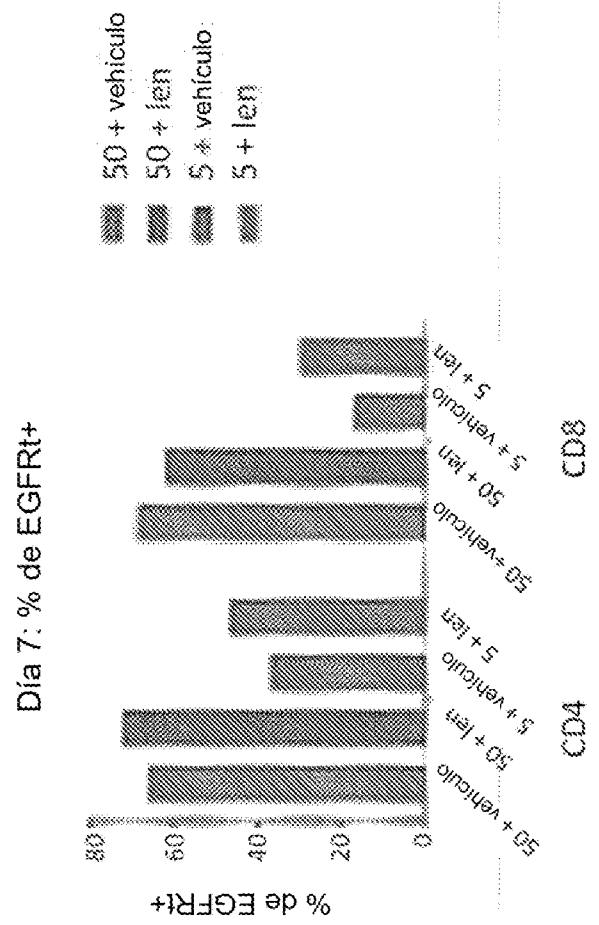


FIG. 9L

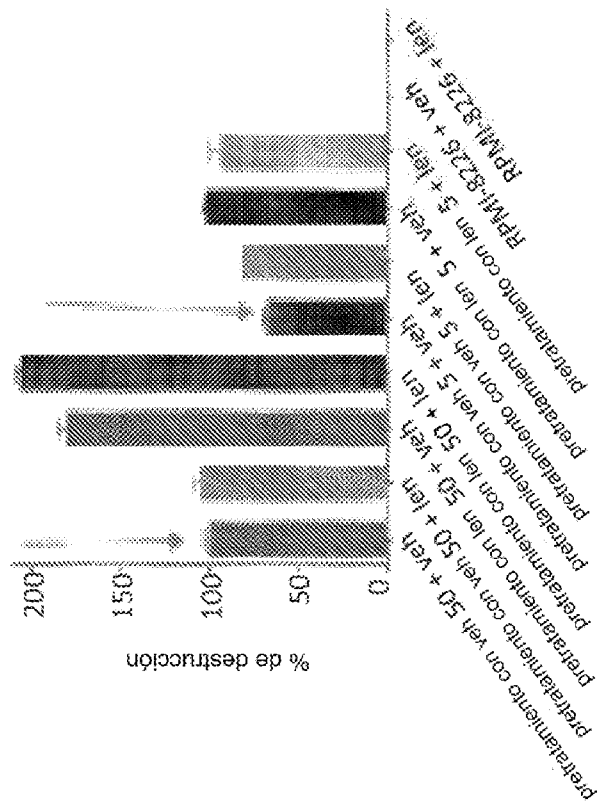


FIG. 9M

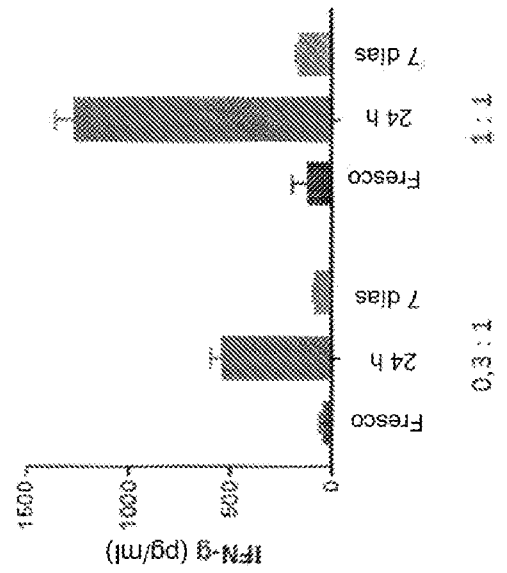
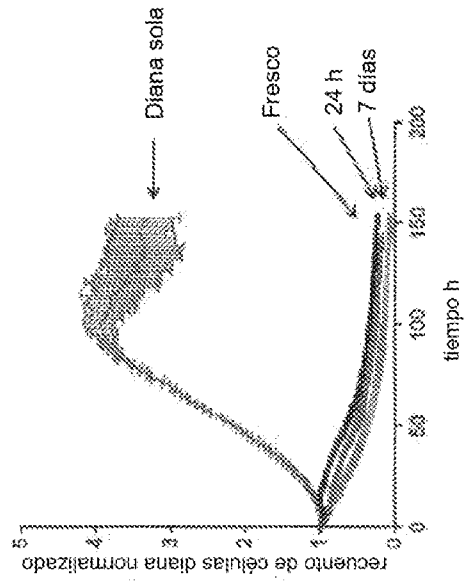
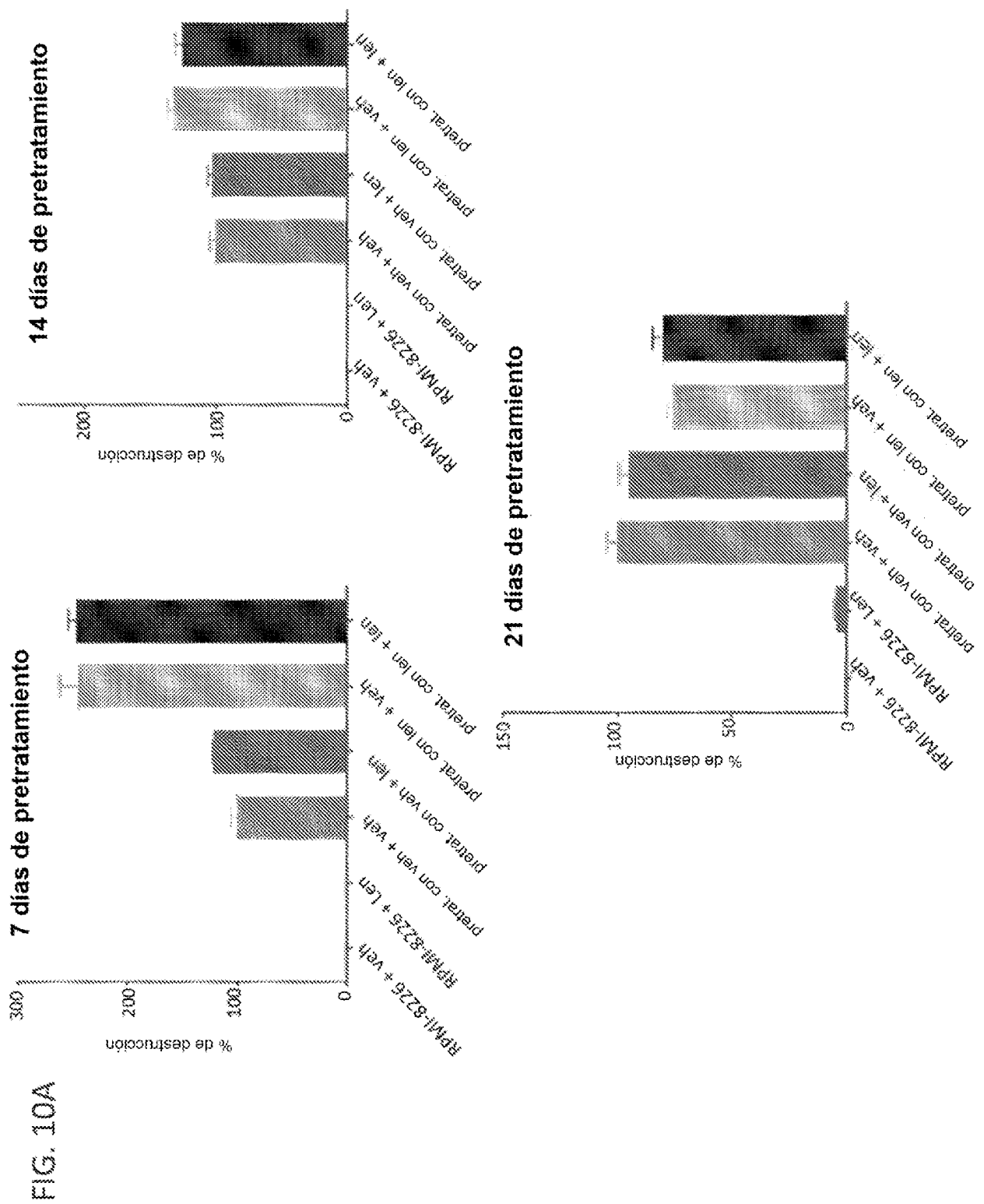
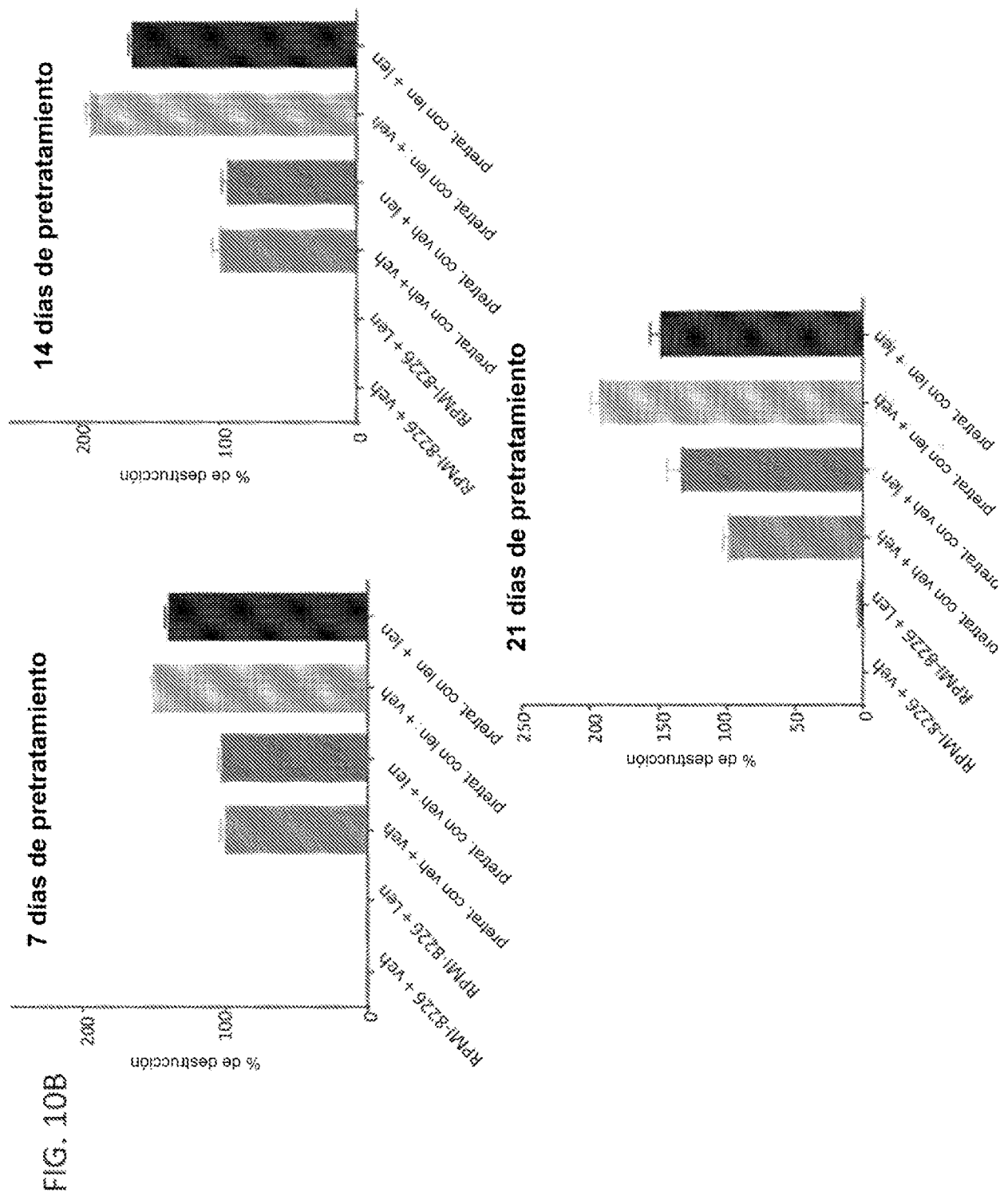


FIG. 9N







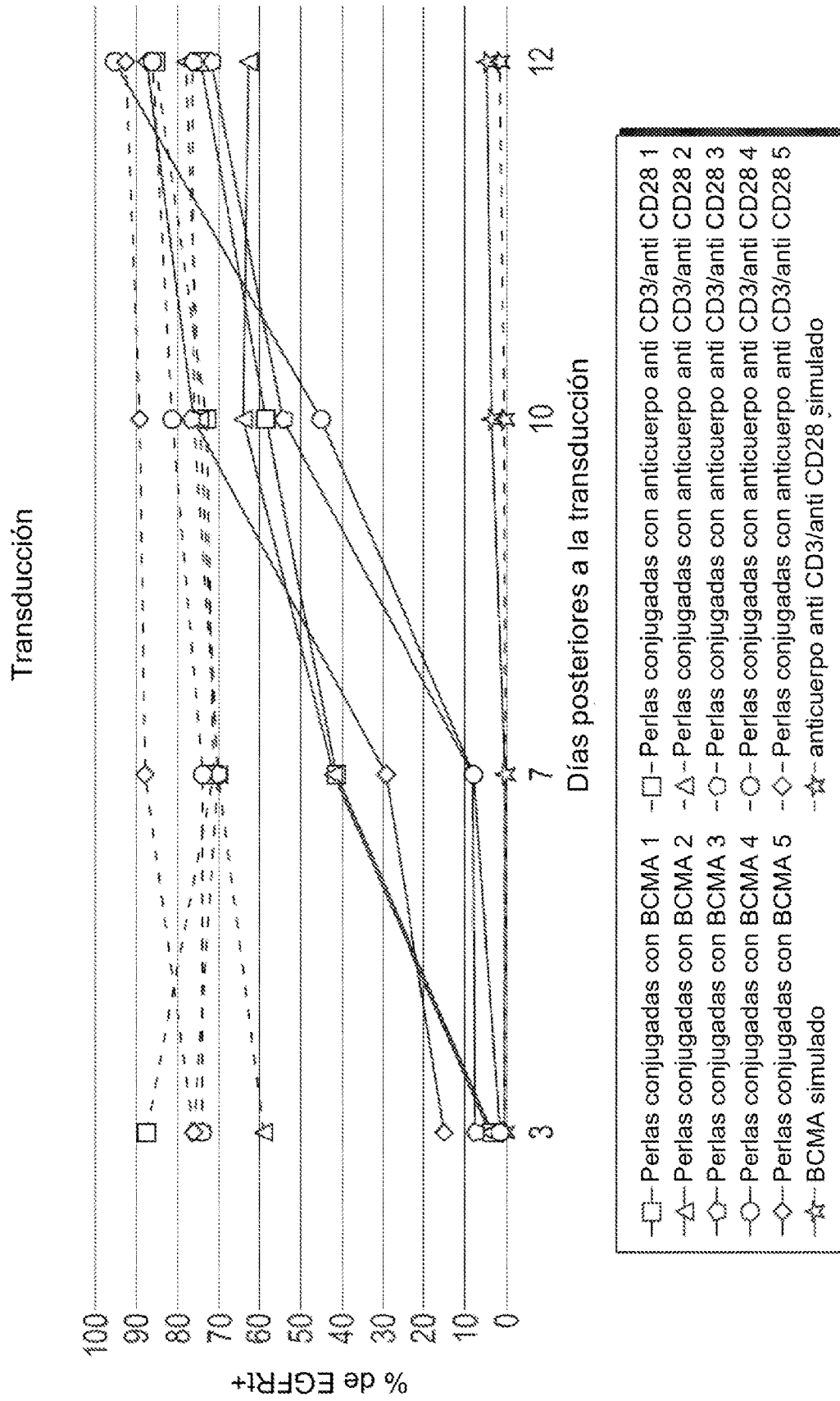


FIG. 11

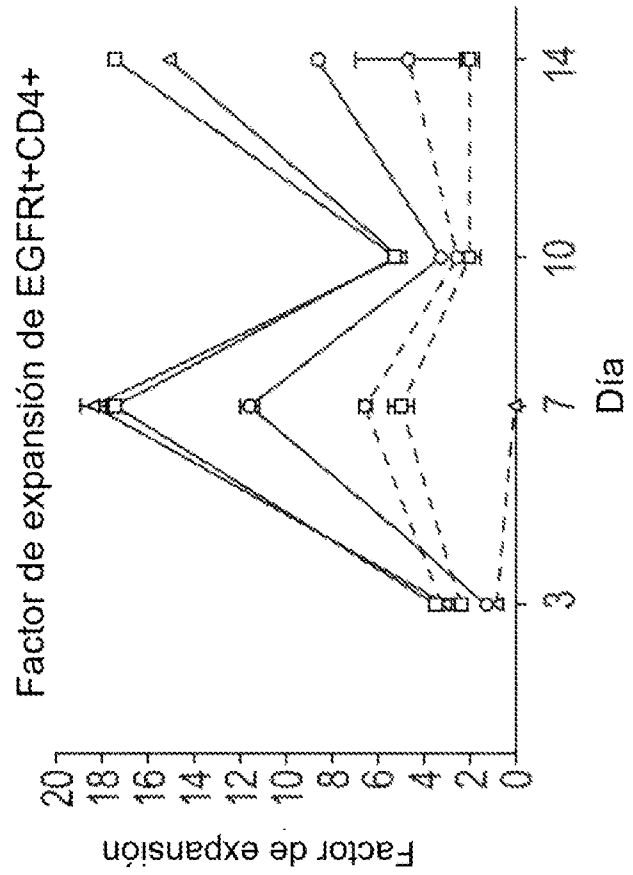
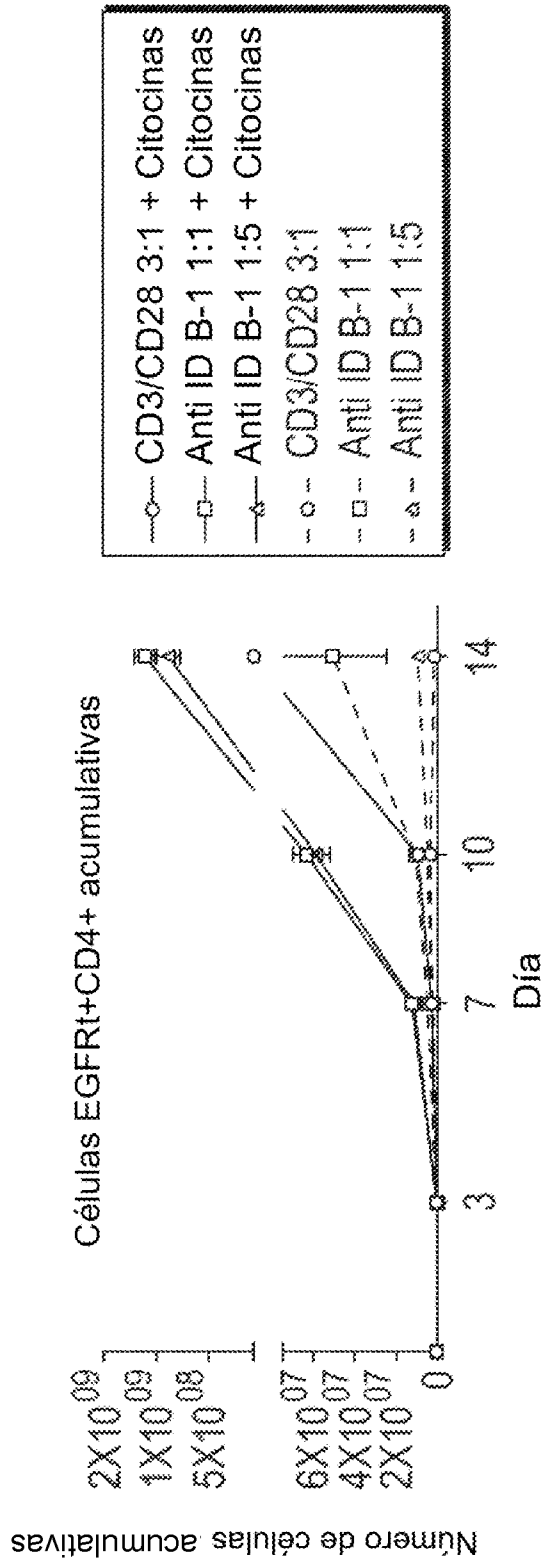


FIG. 12A

FIG. 12B

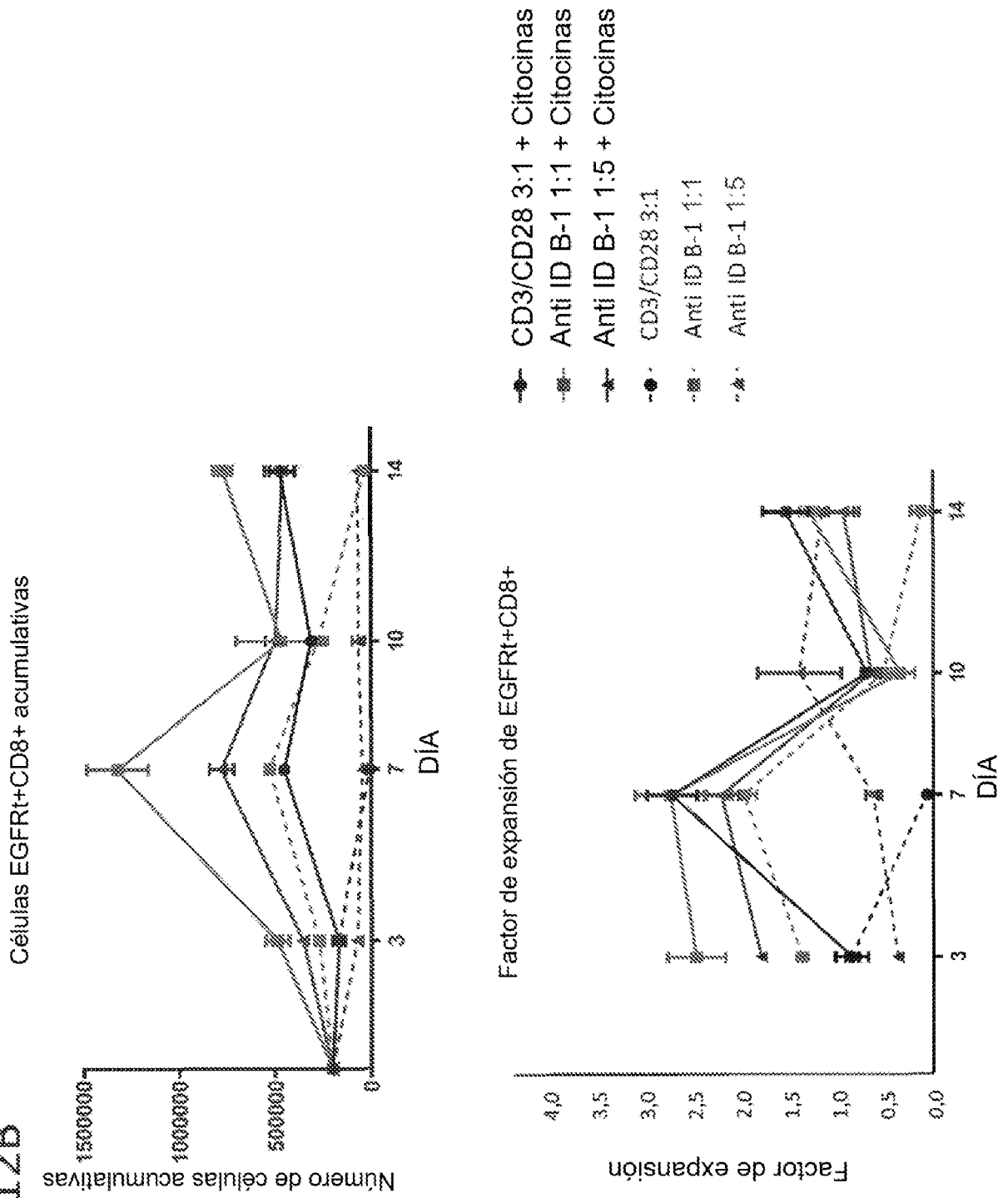


FIG. 13

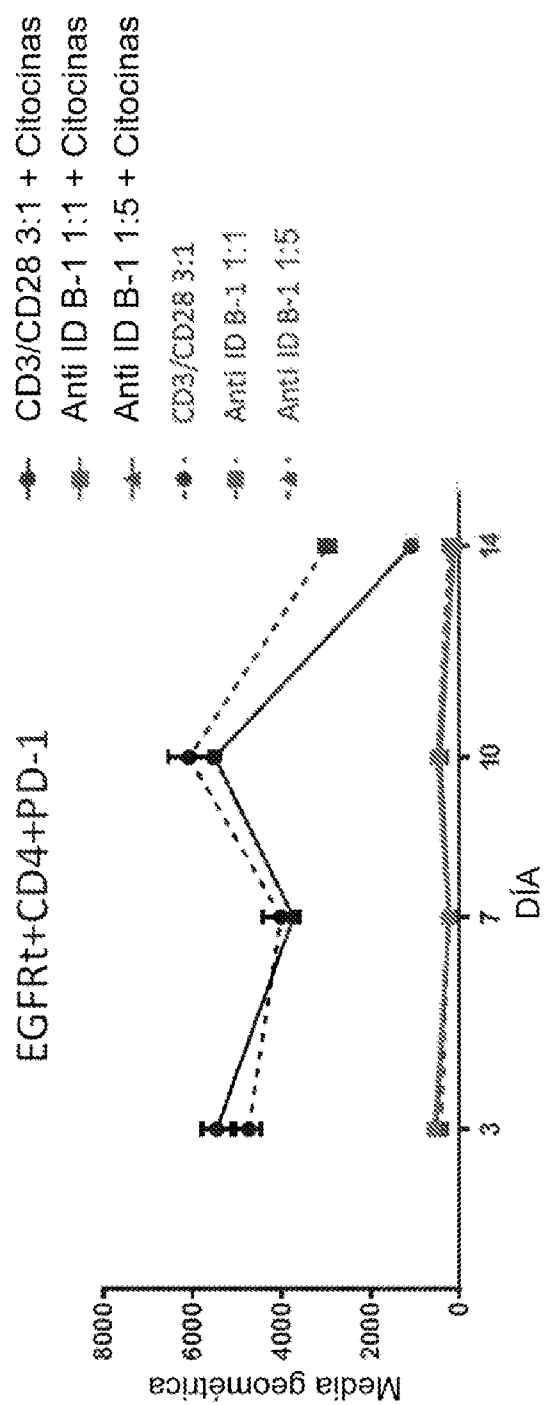
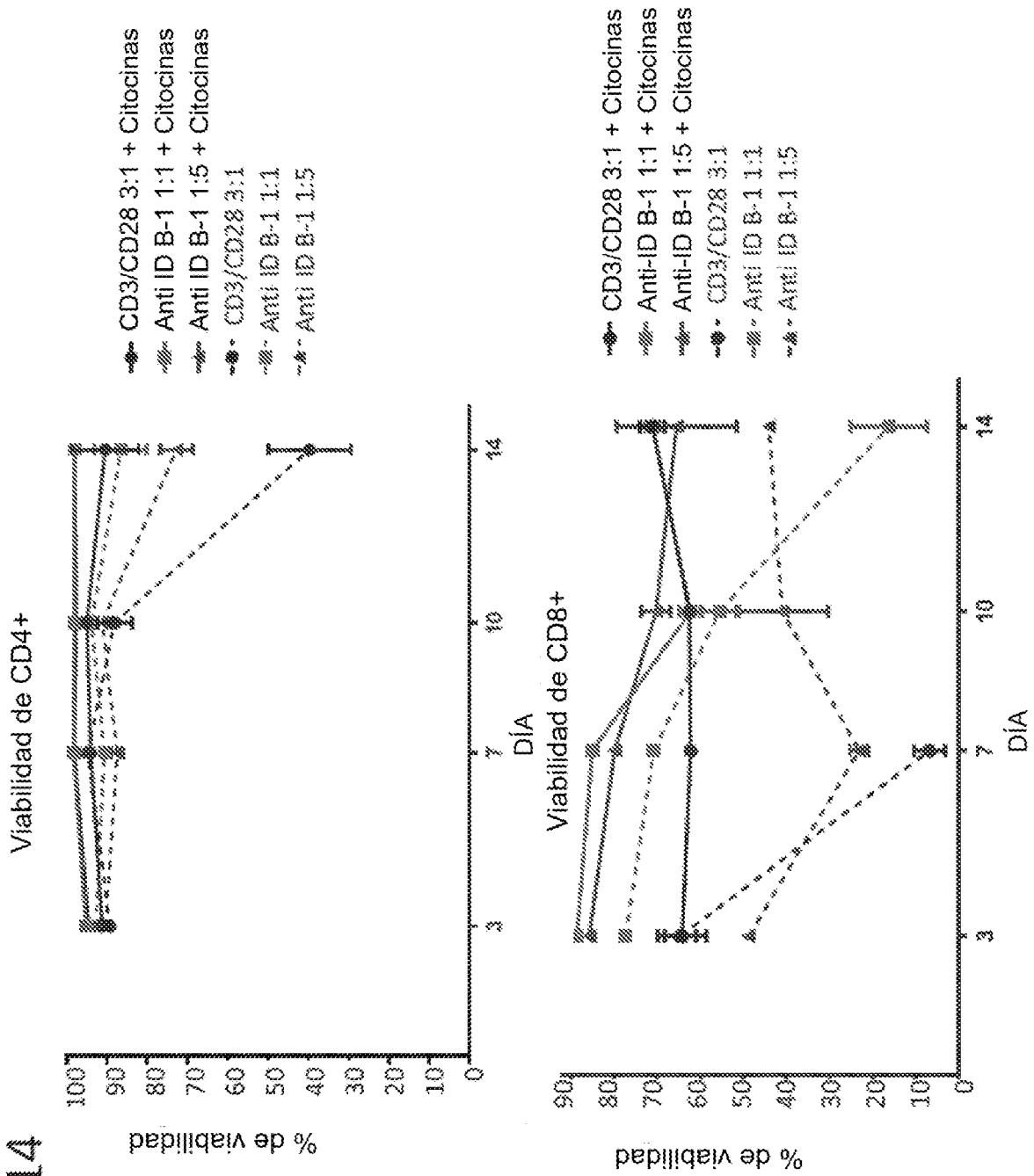


FIG. 14



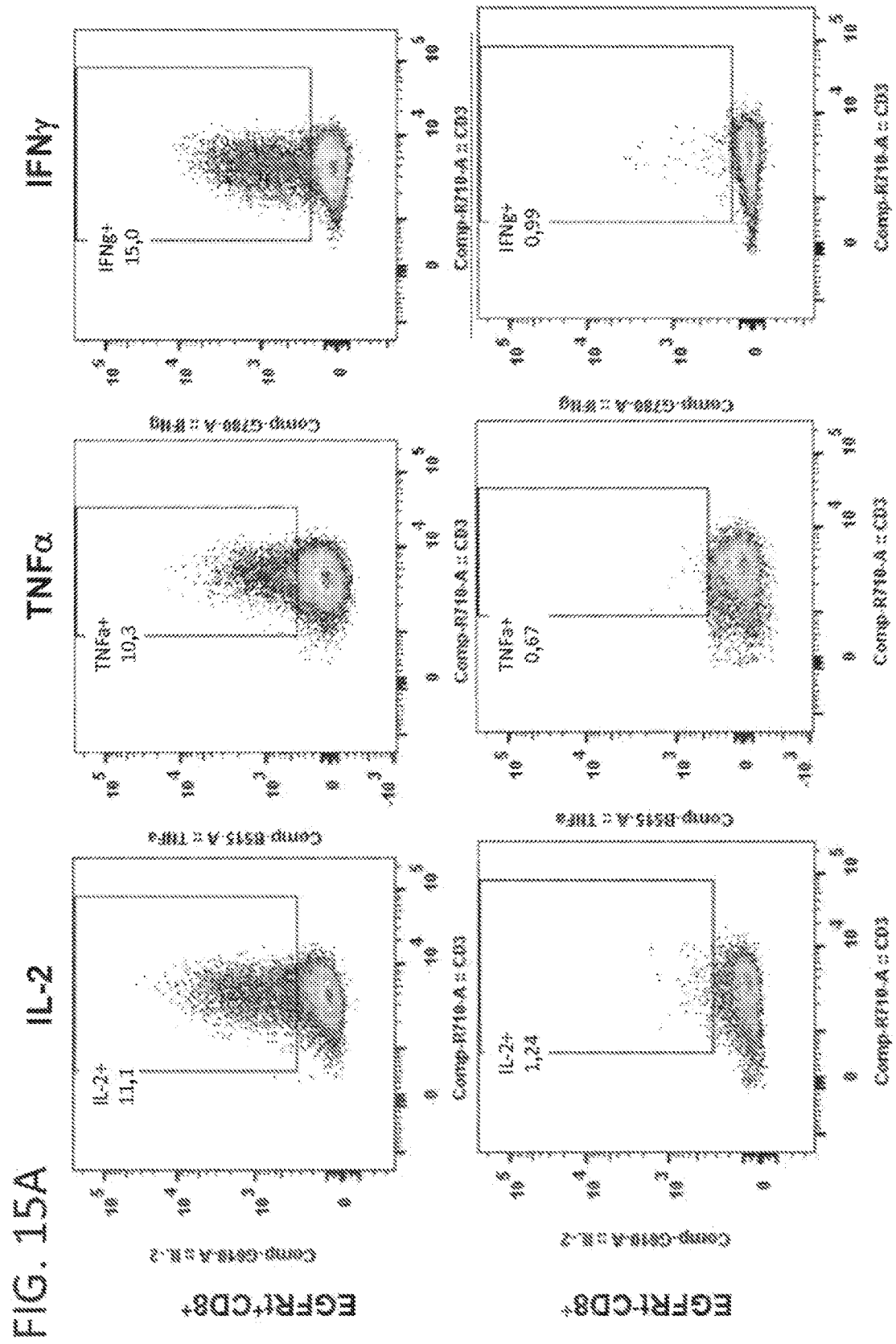
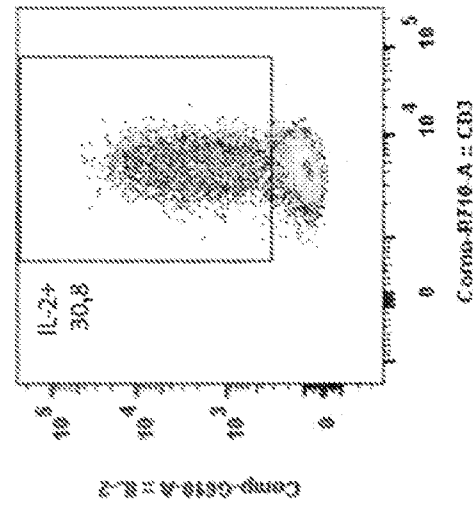
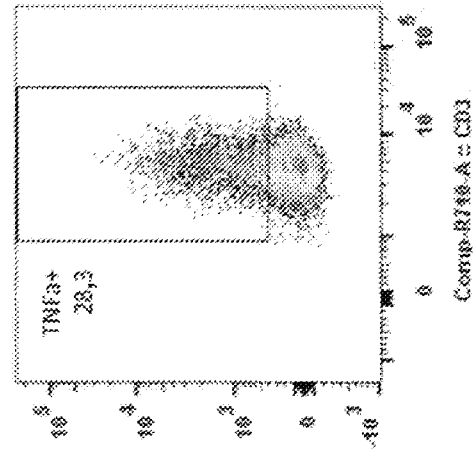


FIG. 15B

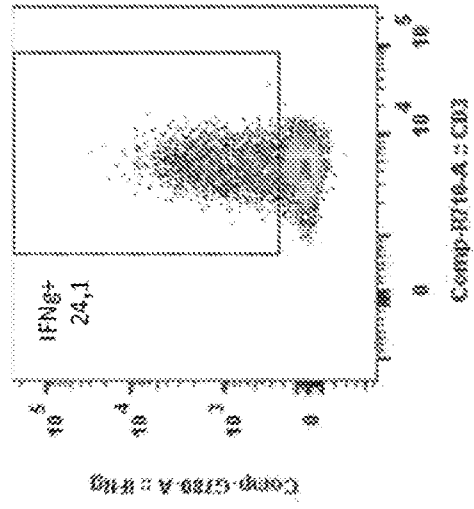
IL-2



TNF α



IFN γ



K562-CD19 (E:D = 1:2)

FIG. 16

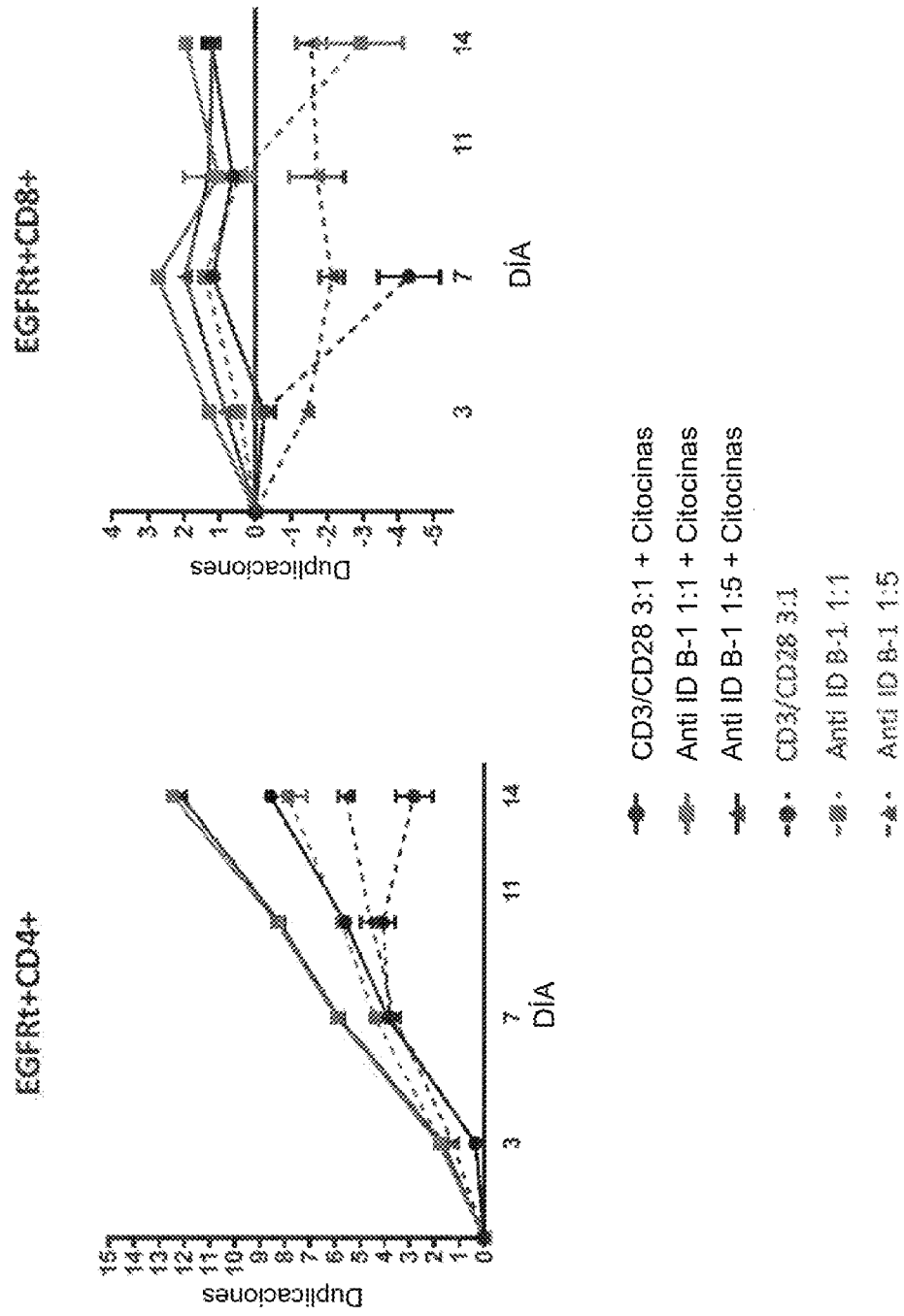


FIG. 17A

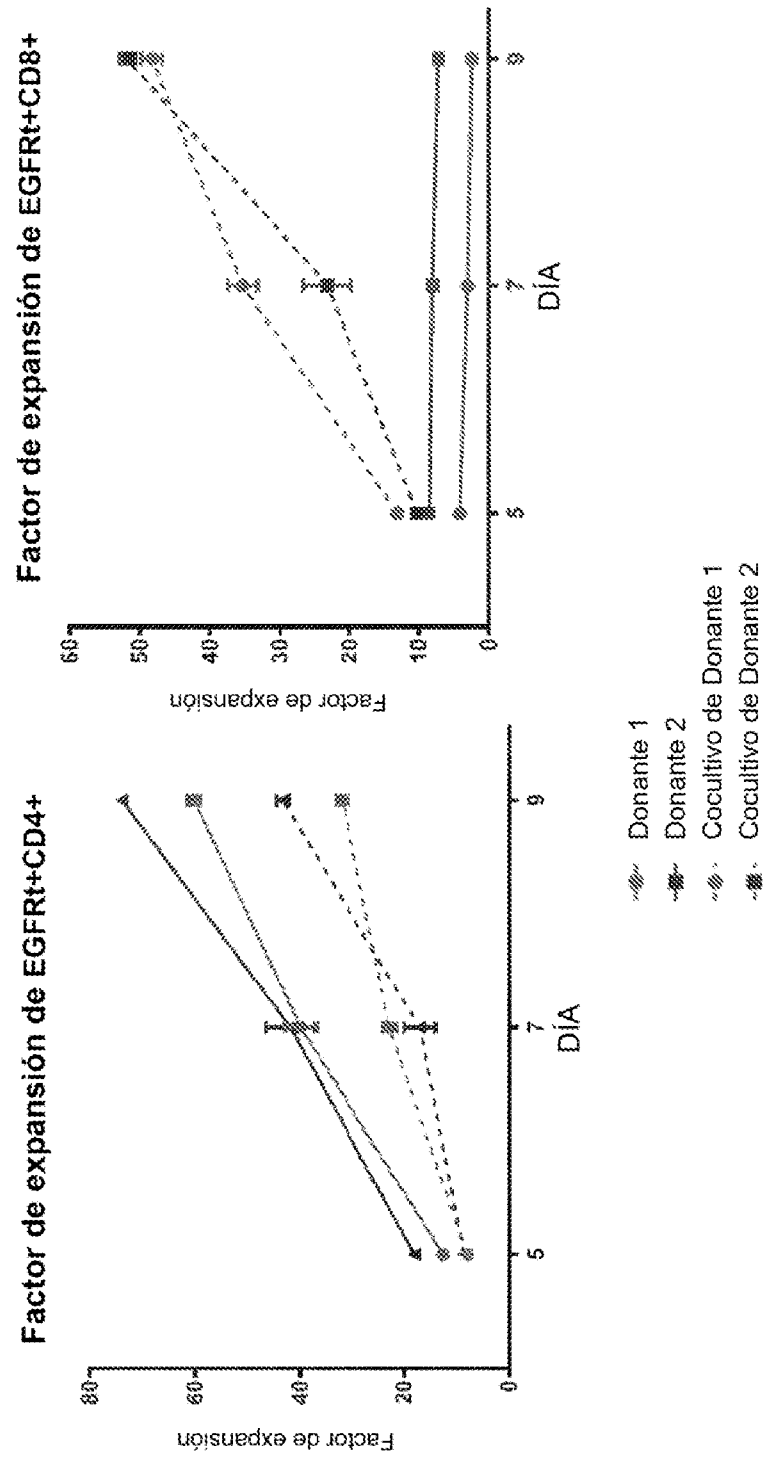


FIG. 17B

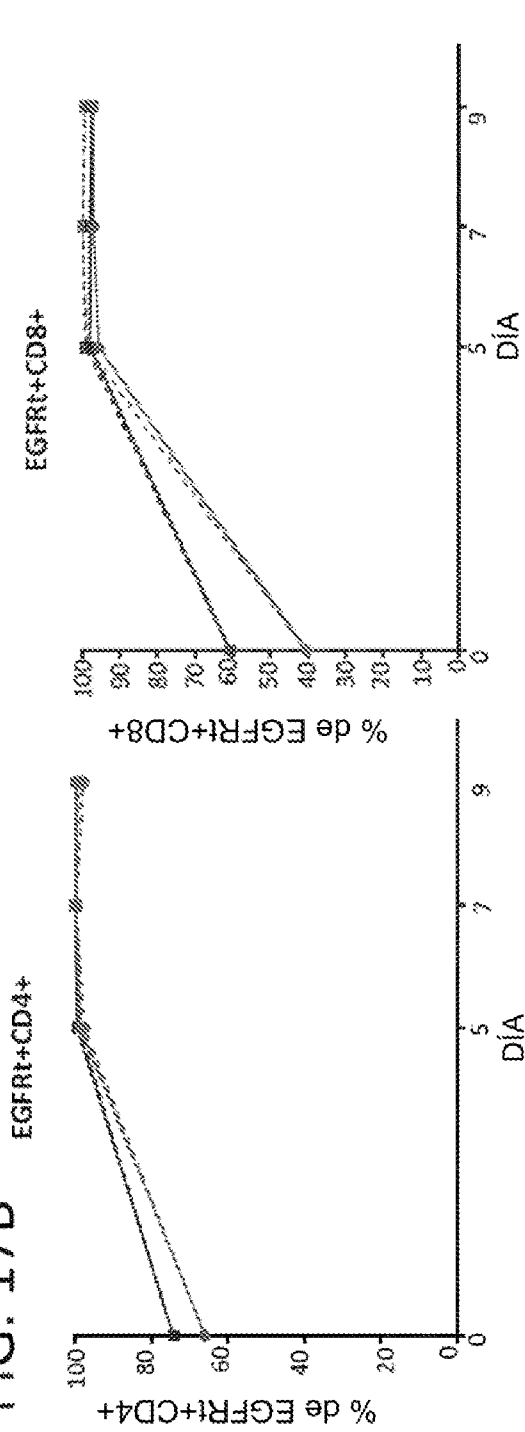


FIG. 17C

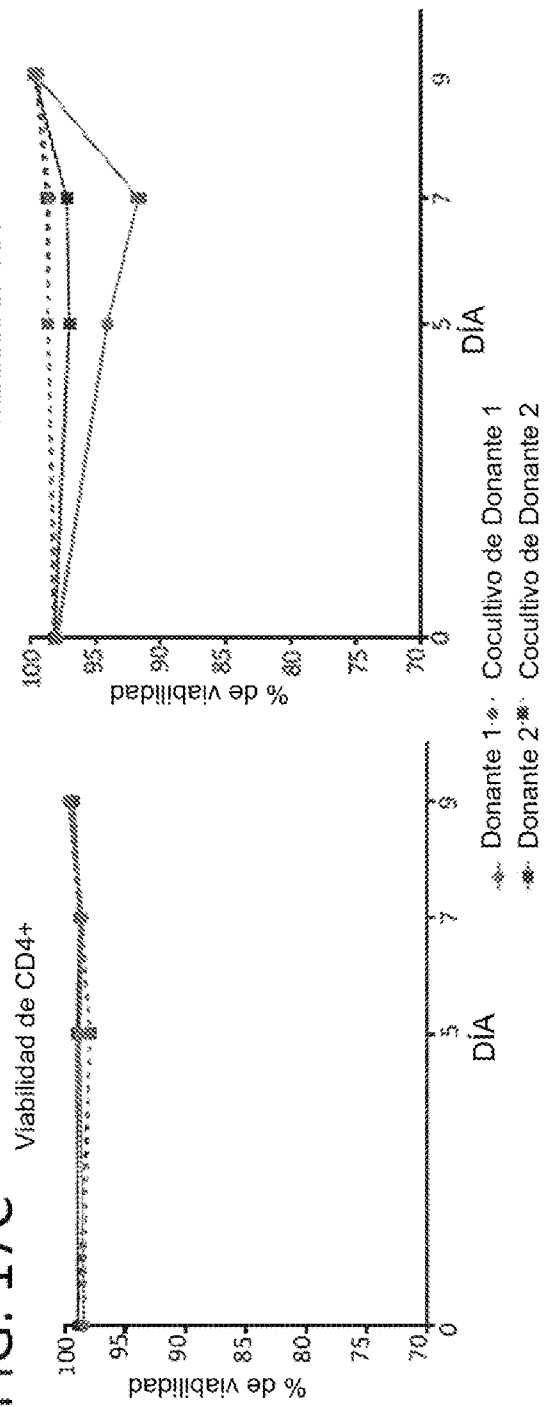


FIG. 18A

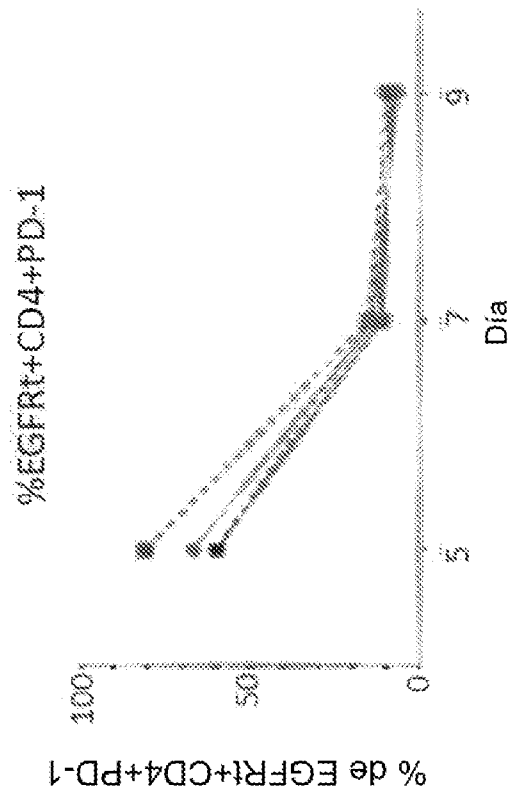


FIG. 18B

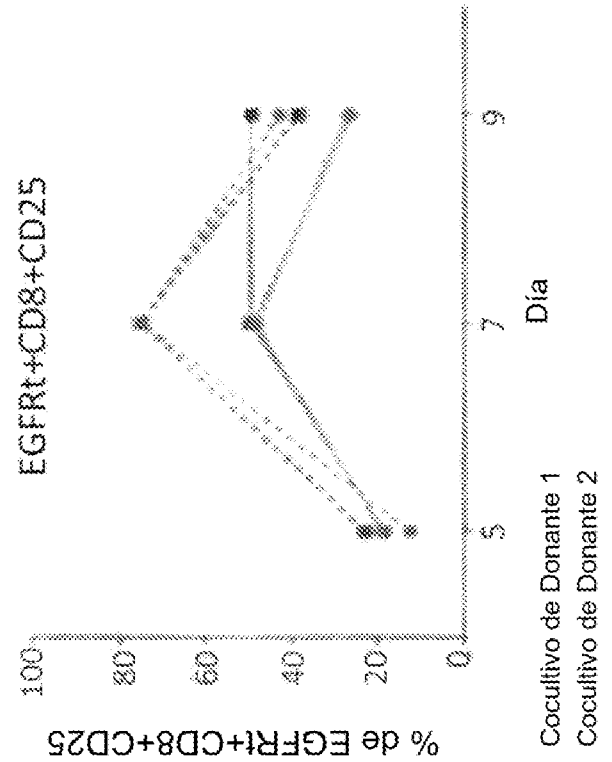
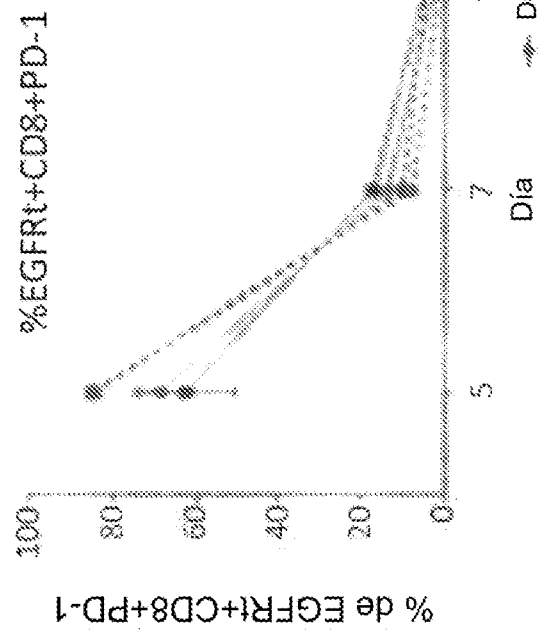
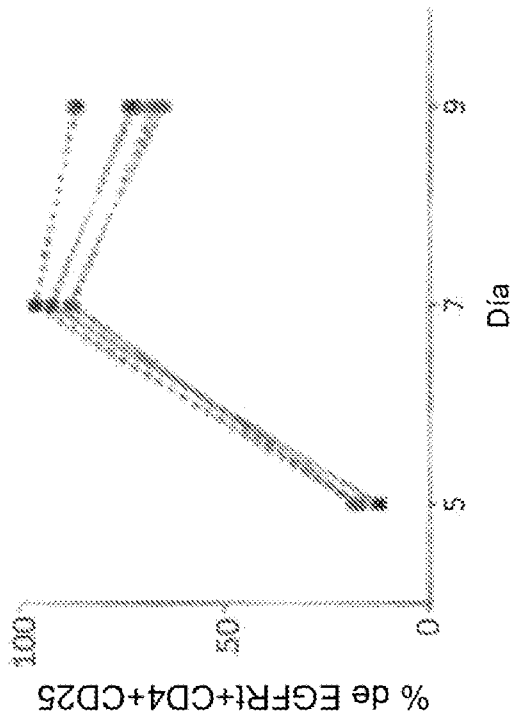


FIG. 19A

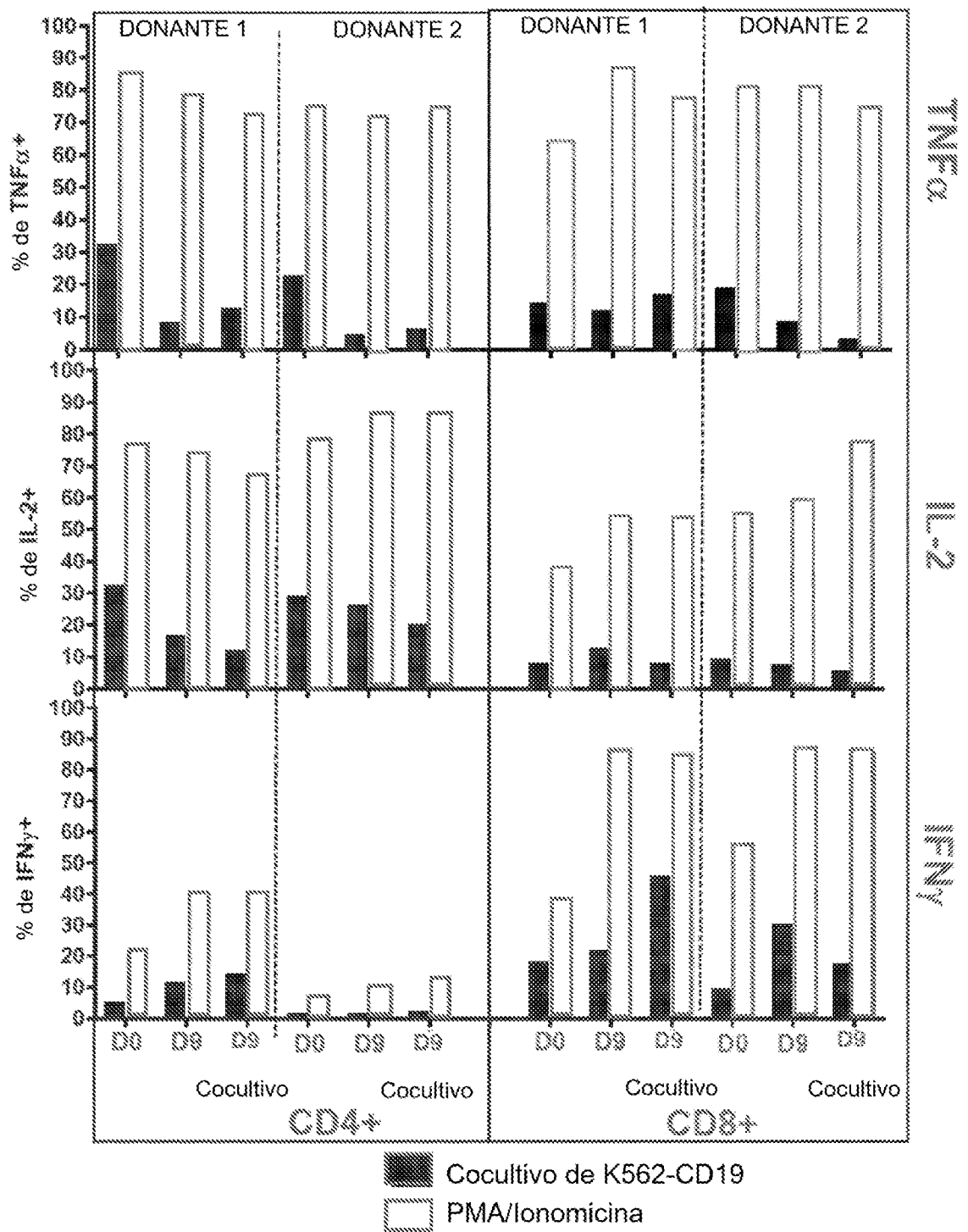
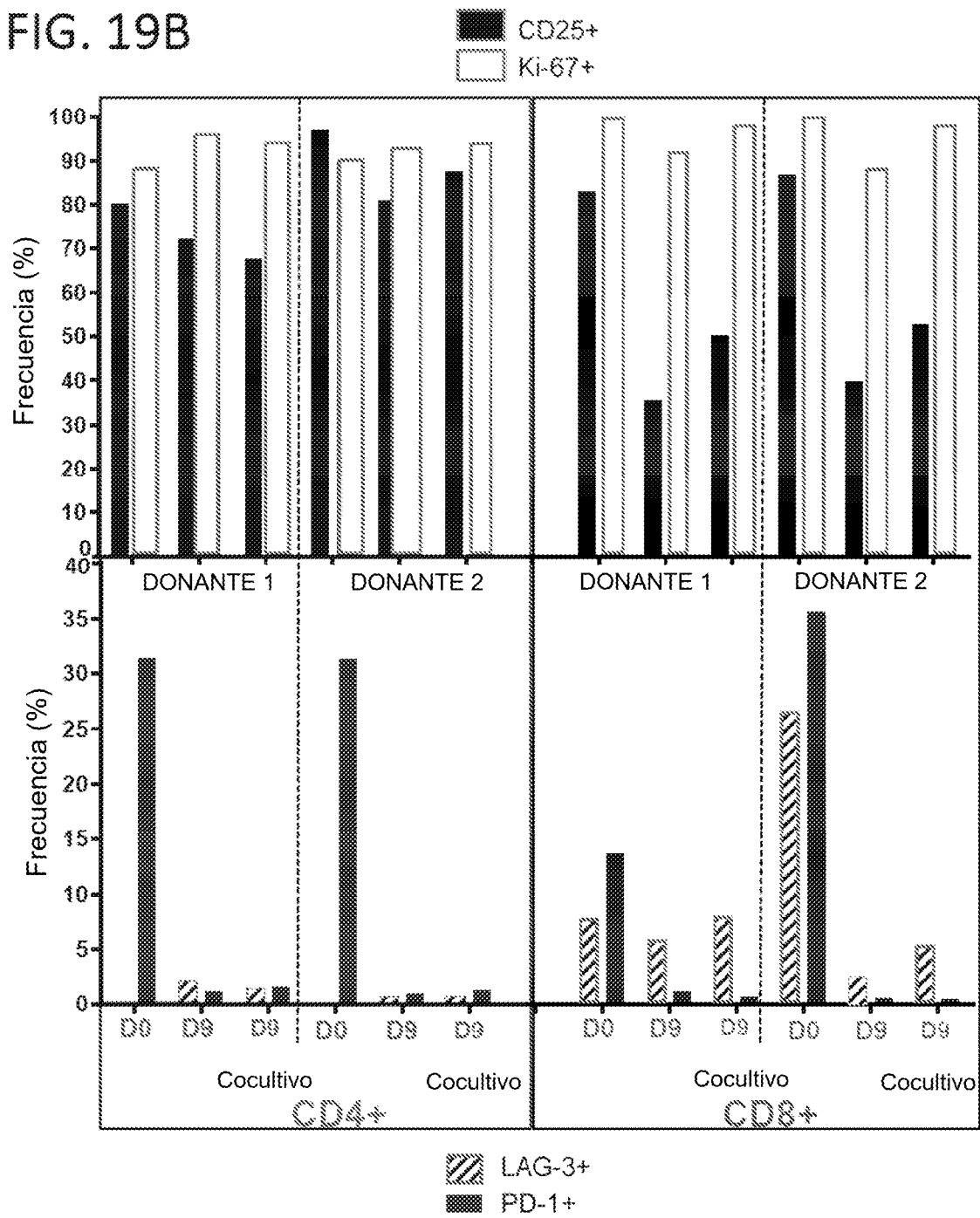


FIG. 19B



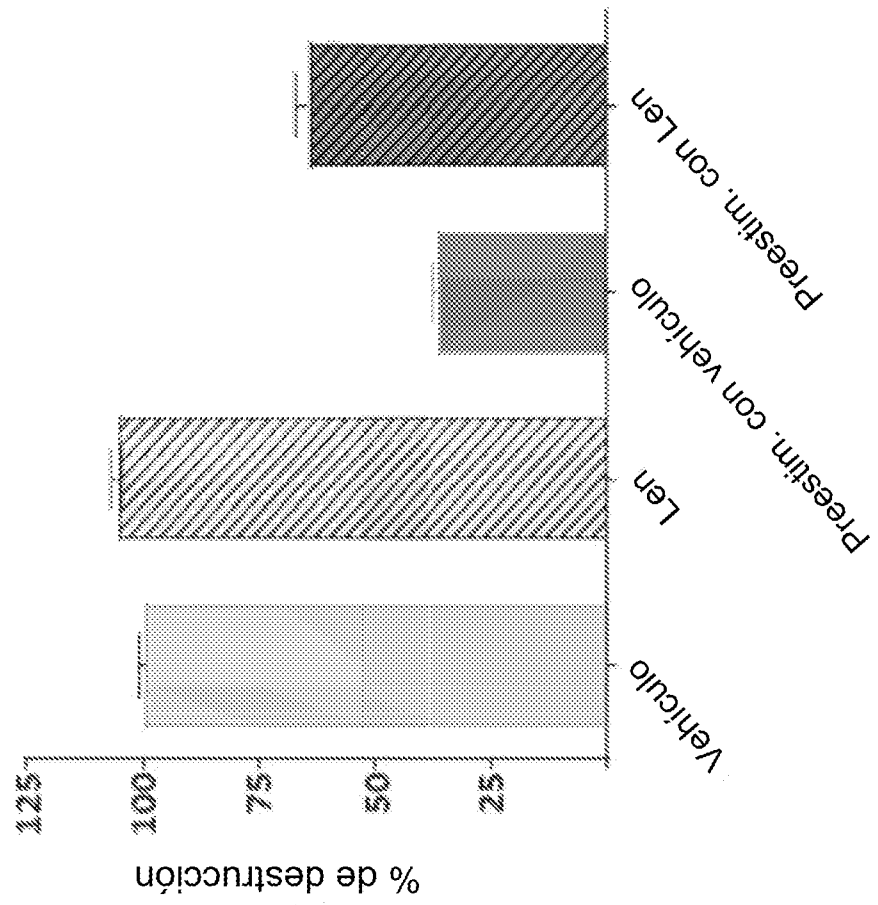


FIG. 20A

FIG. 20B

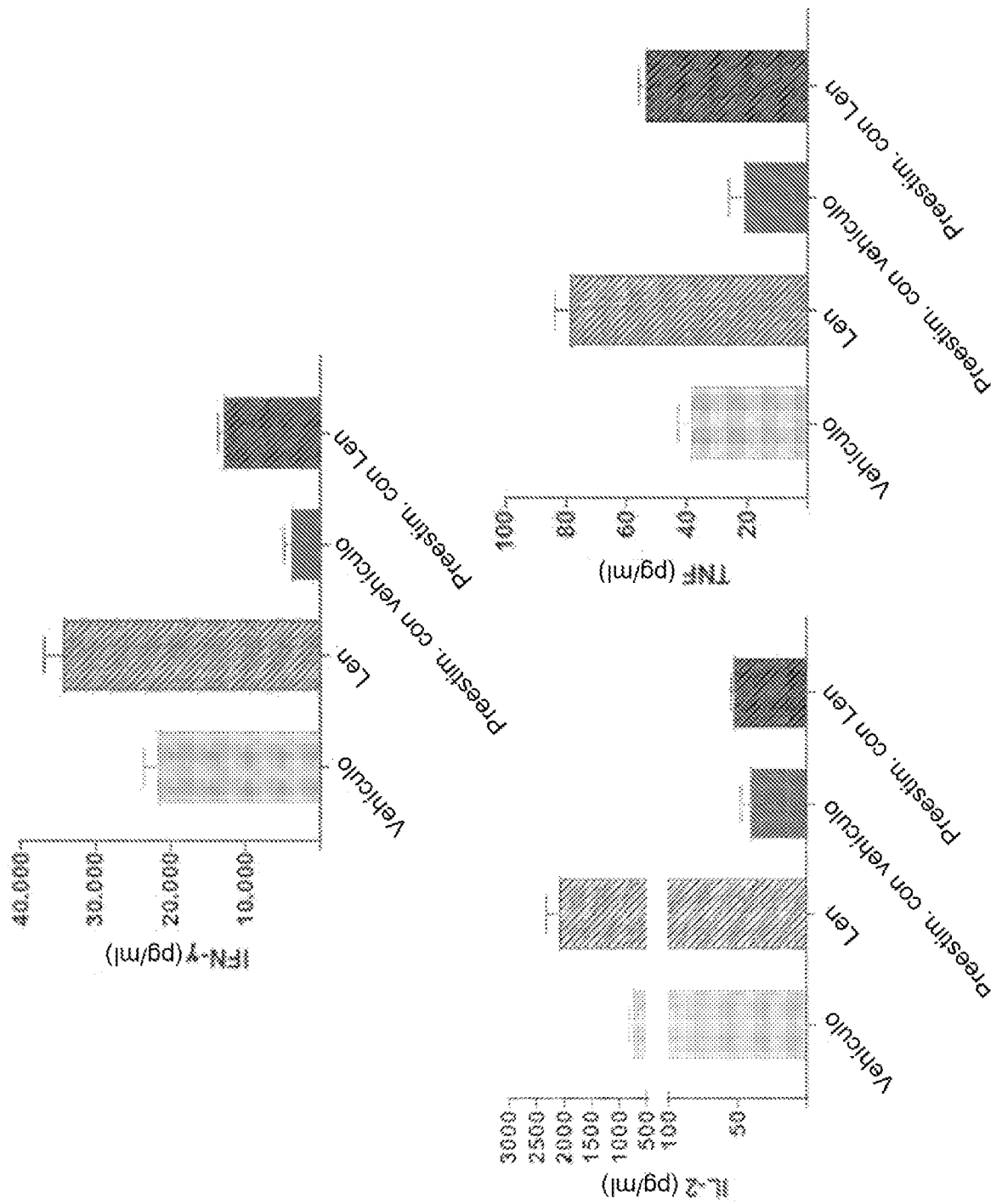


FIG. 20C

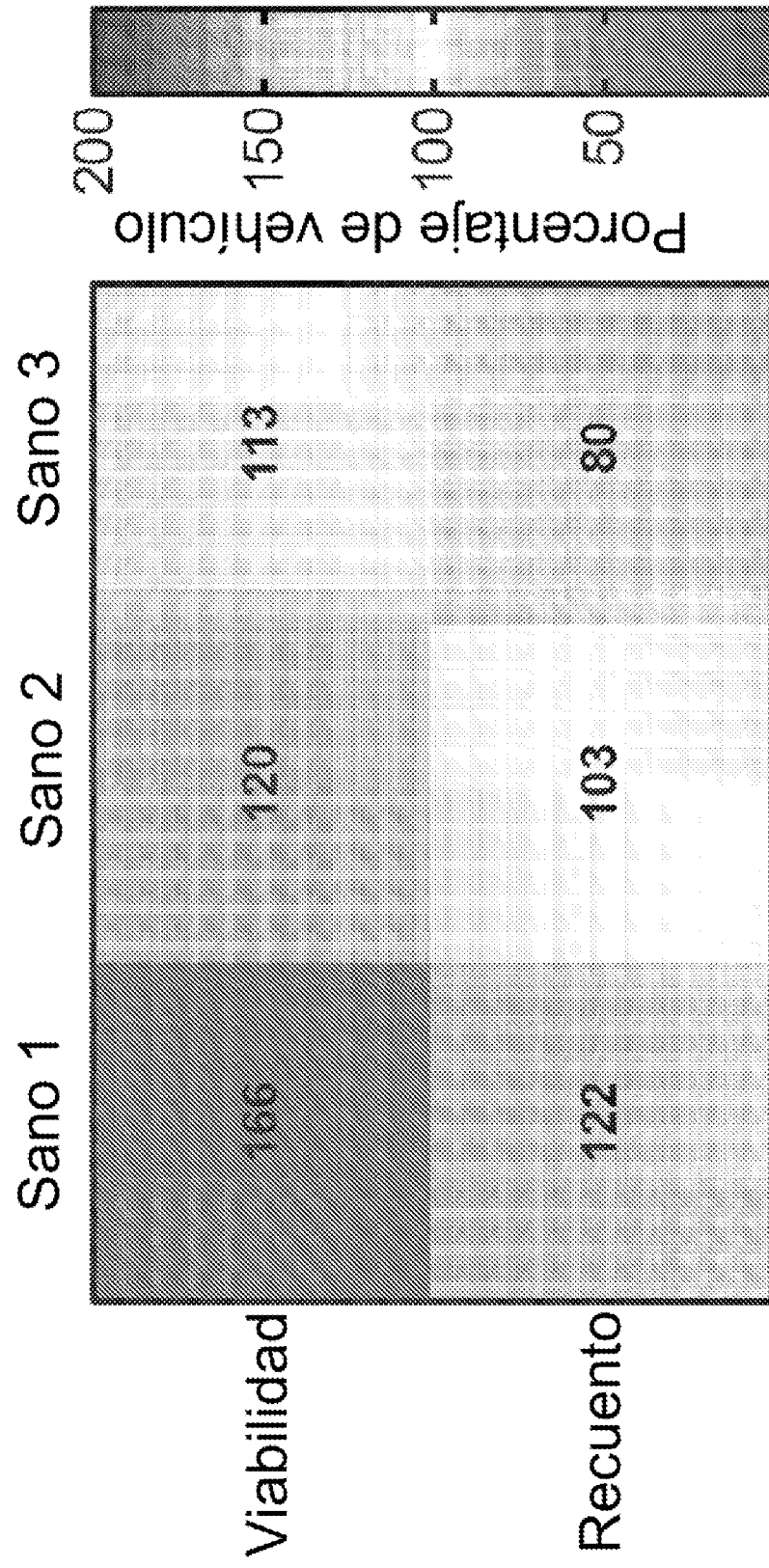


FIG. 20D

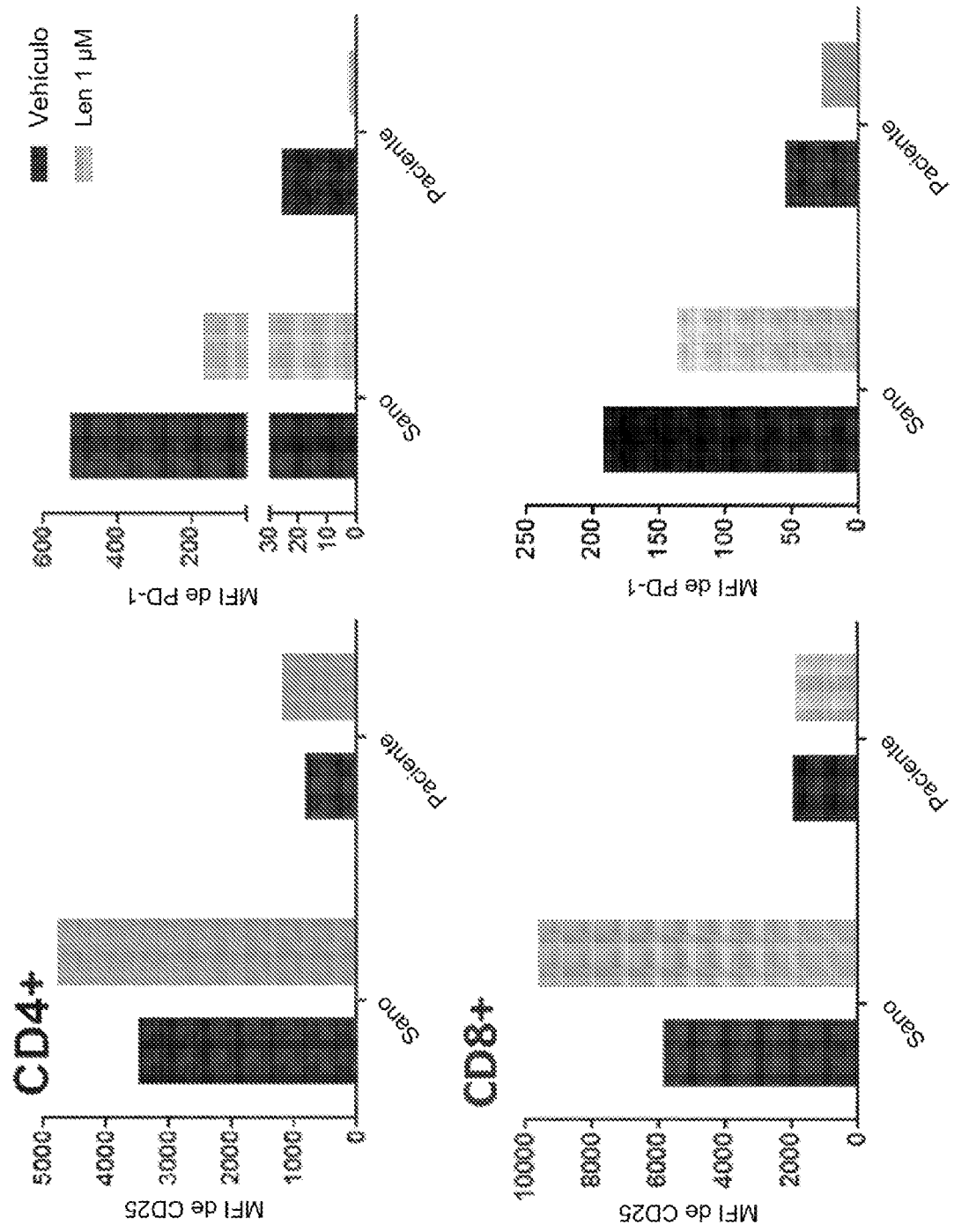


FIG. 20E

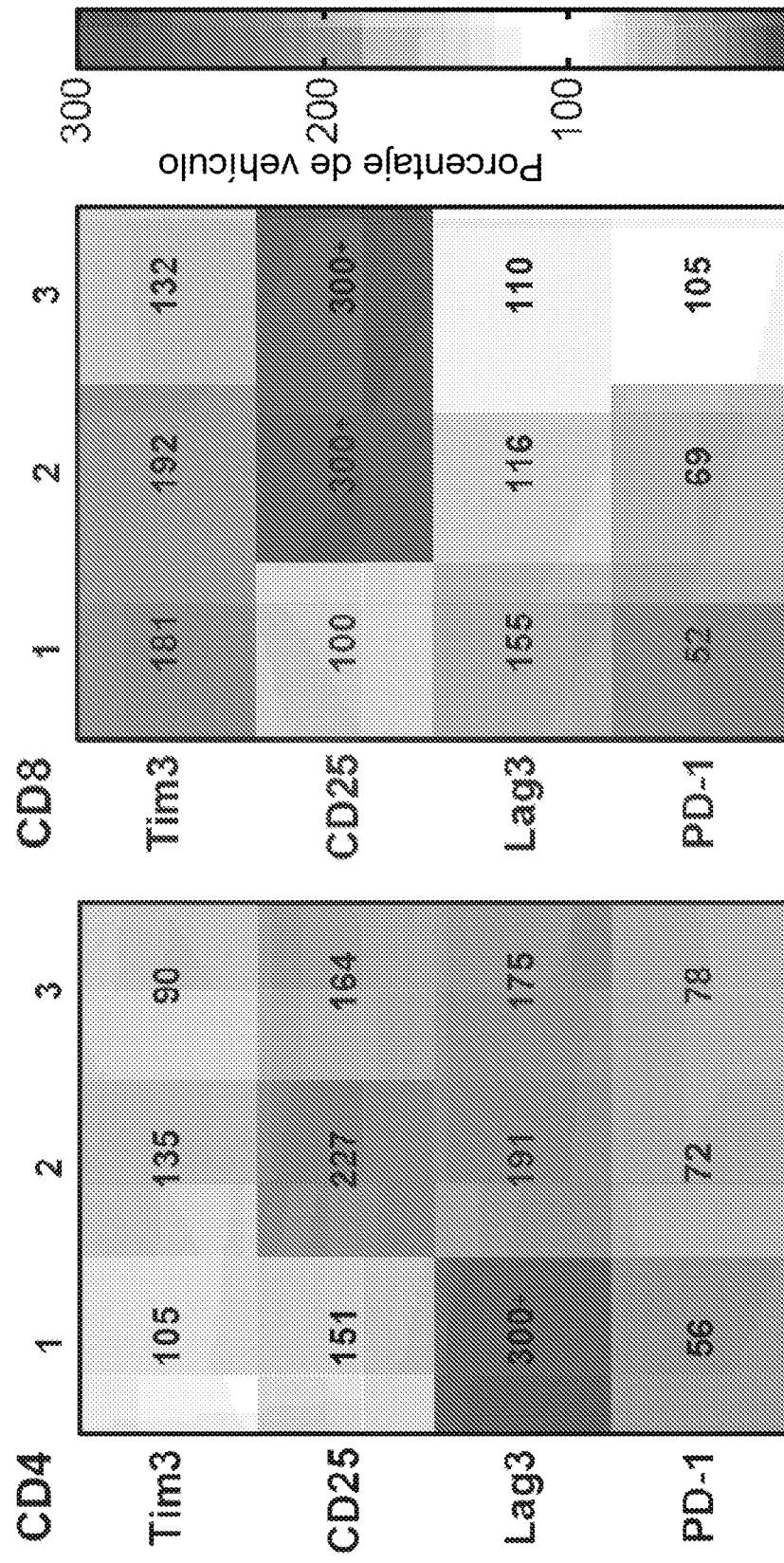


FIG. 21A

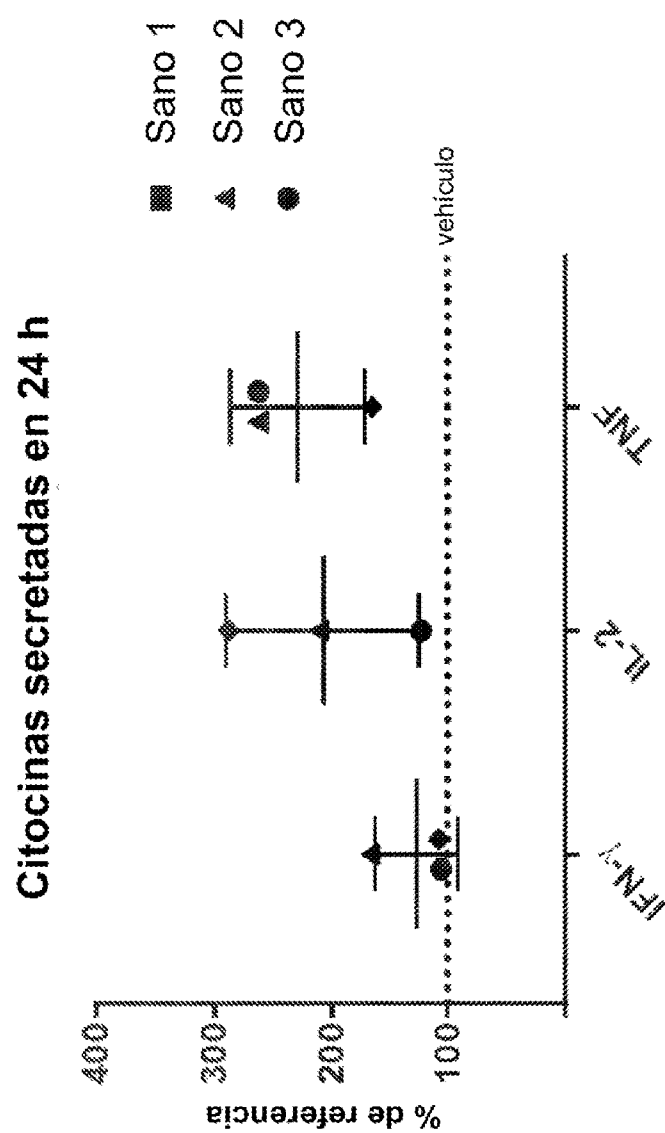


FIG. 21B

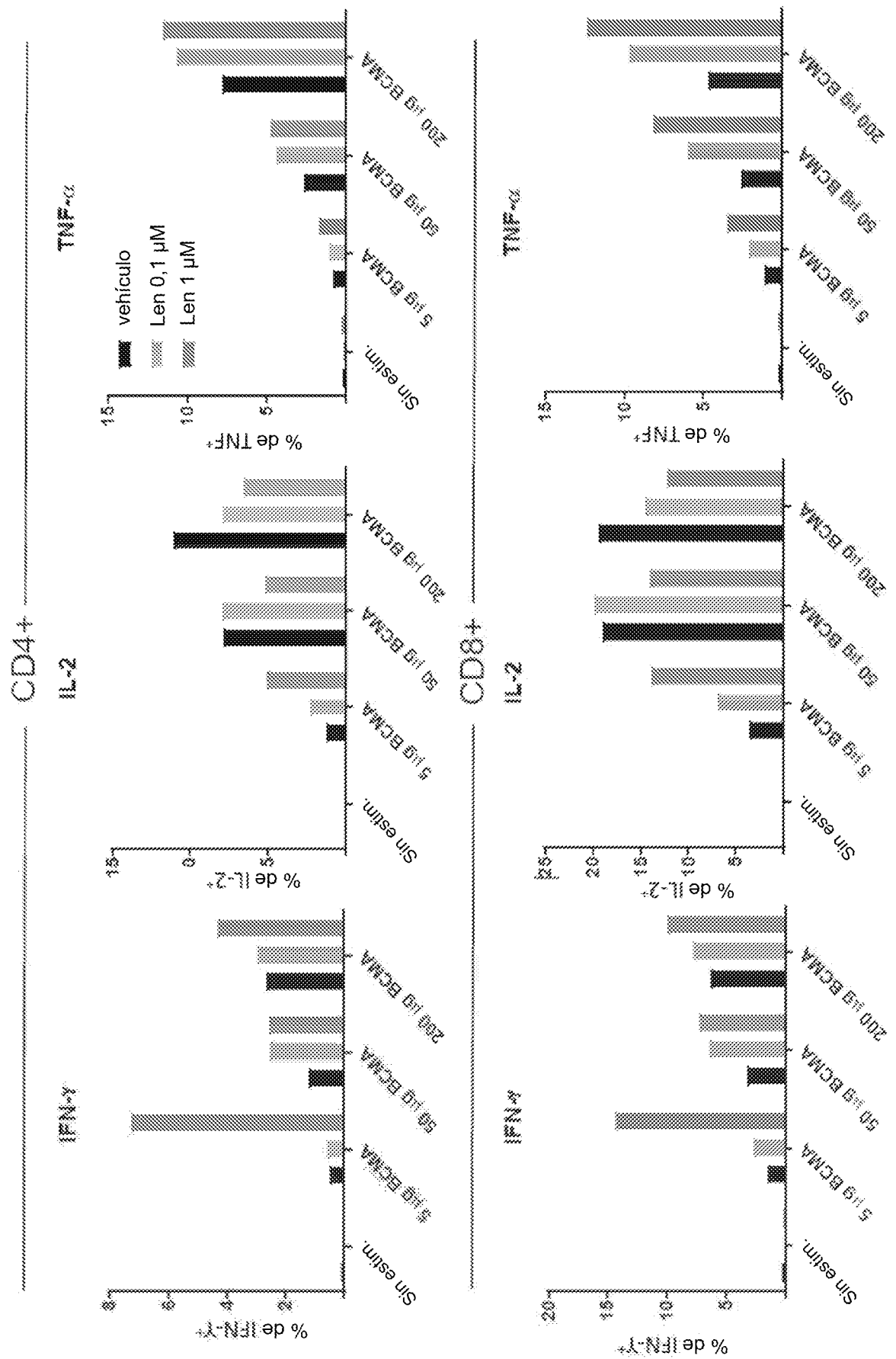


FIG. 21C

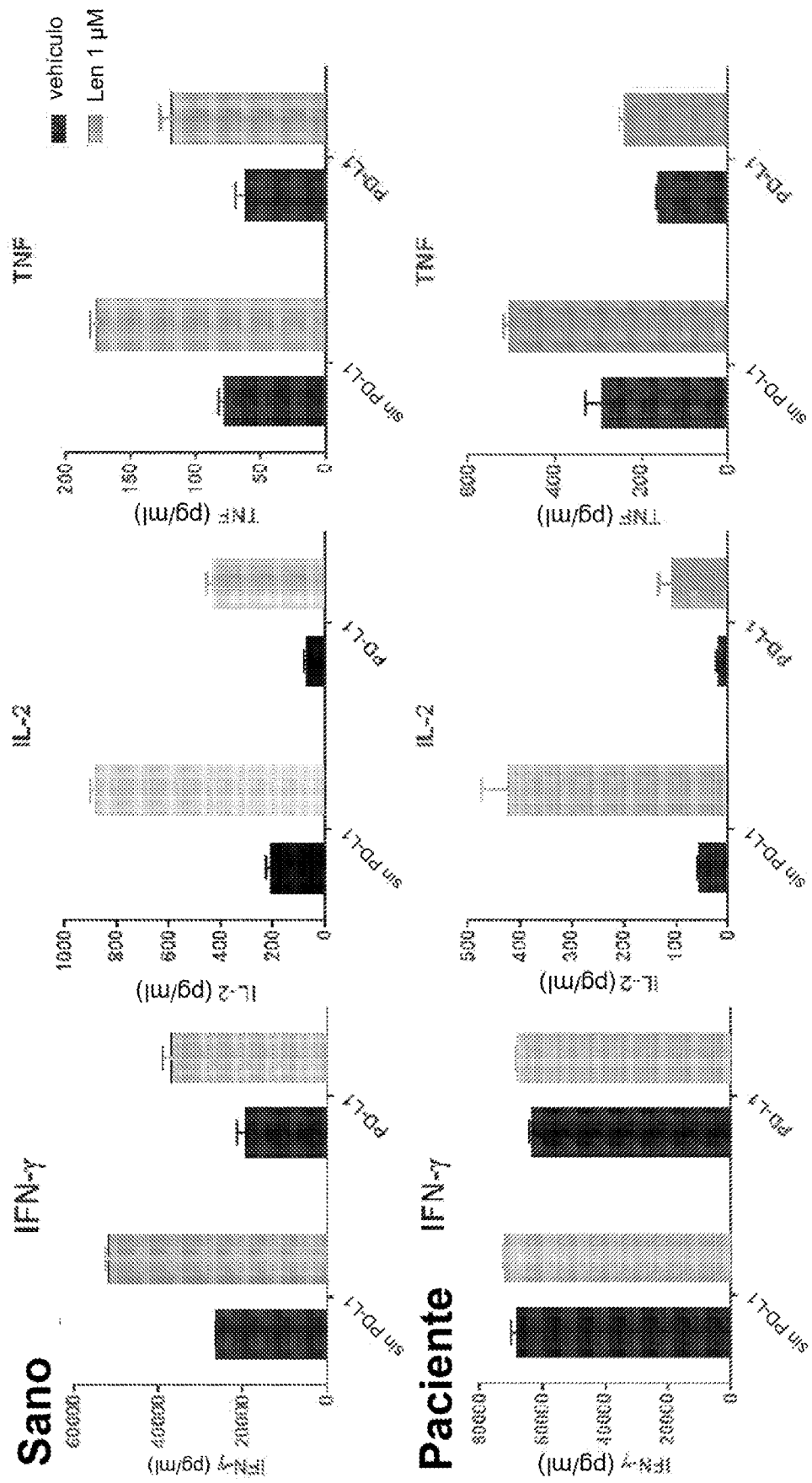


FIG. 22A

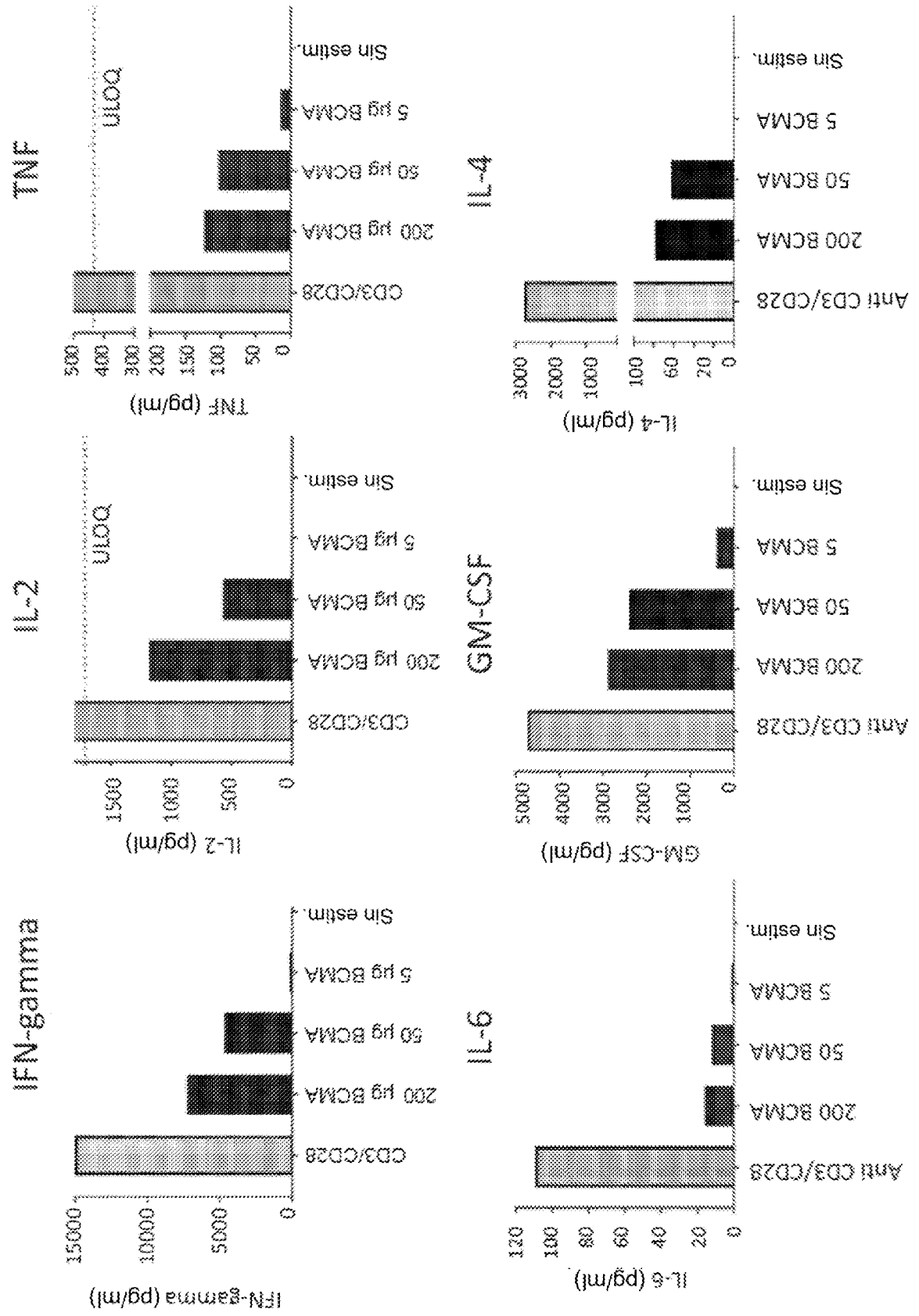
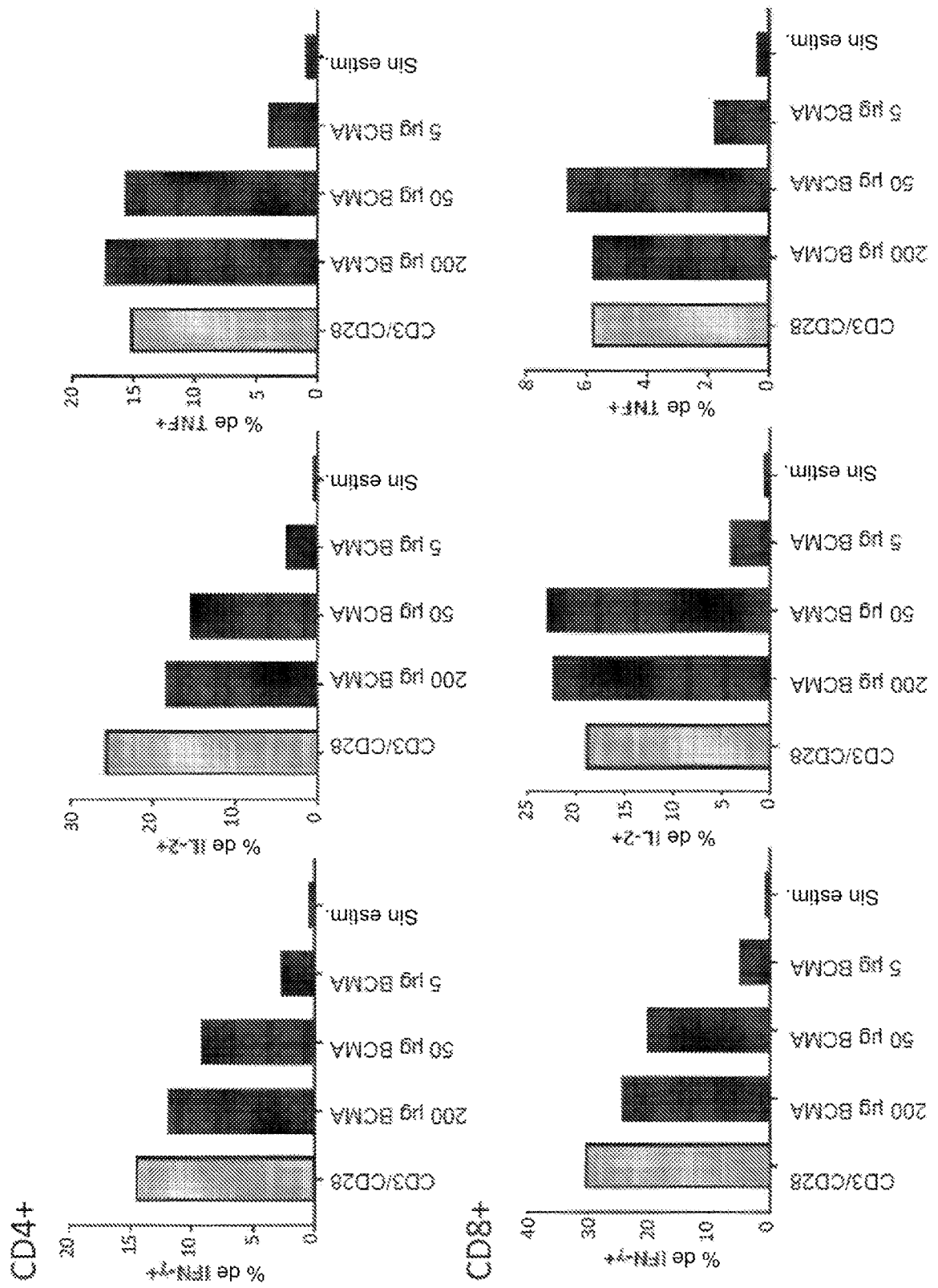


FIG. 22B



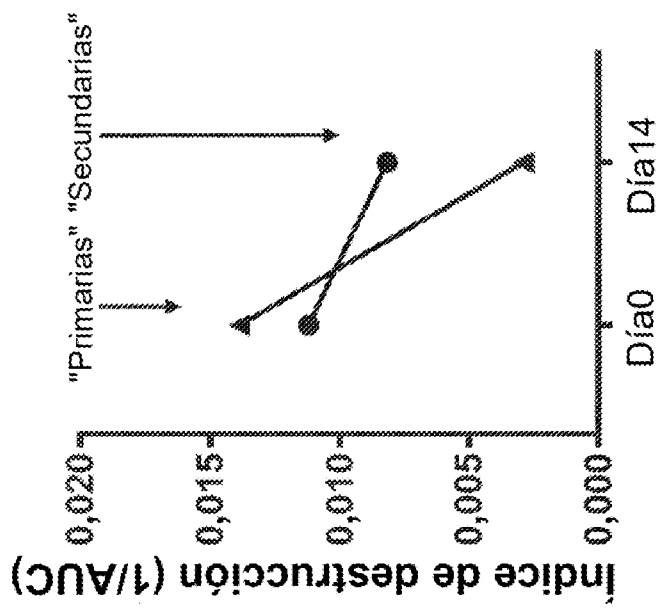


FIG. 23A

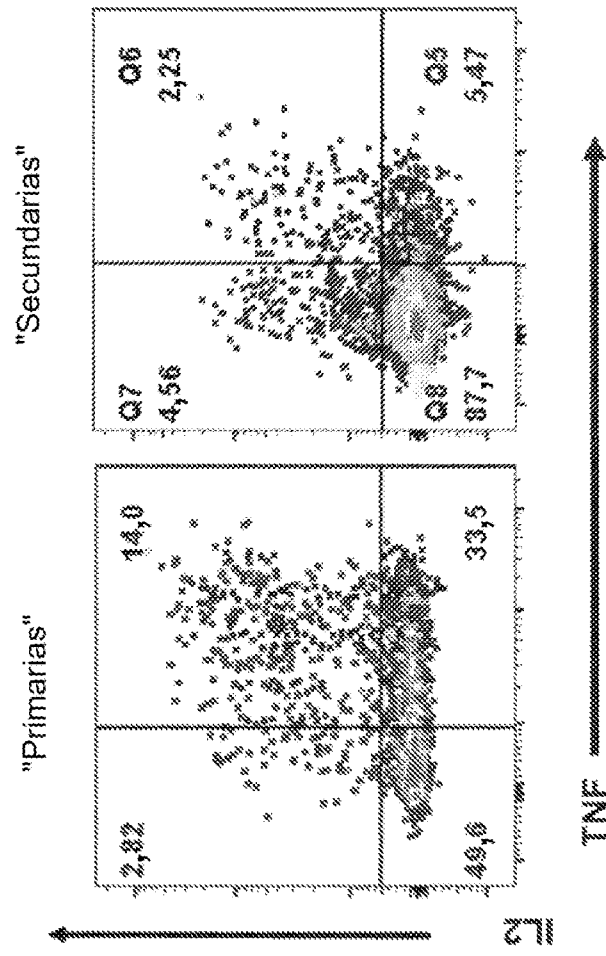
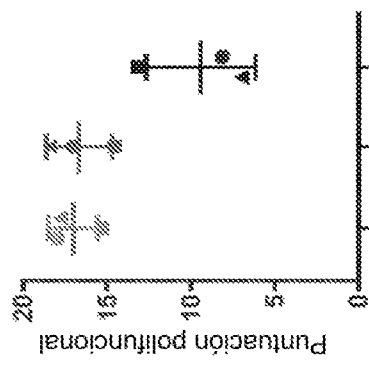
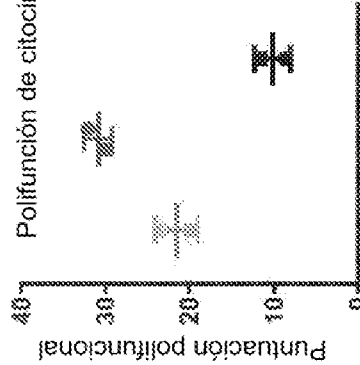


FIG. 23B

Polifunción de citocinas primarias

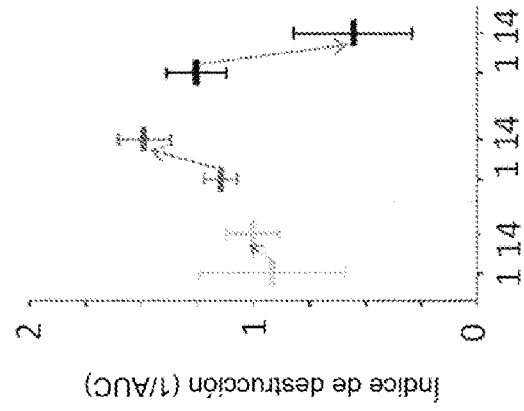


Polifunción de citocinas secundarias



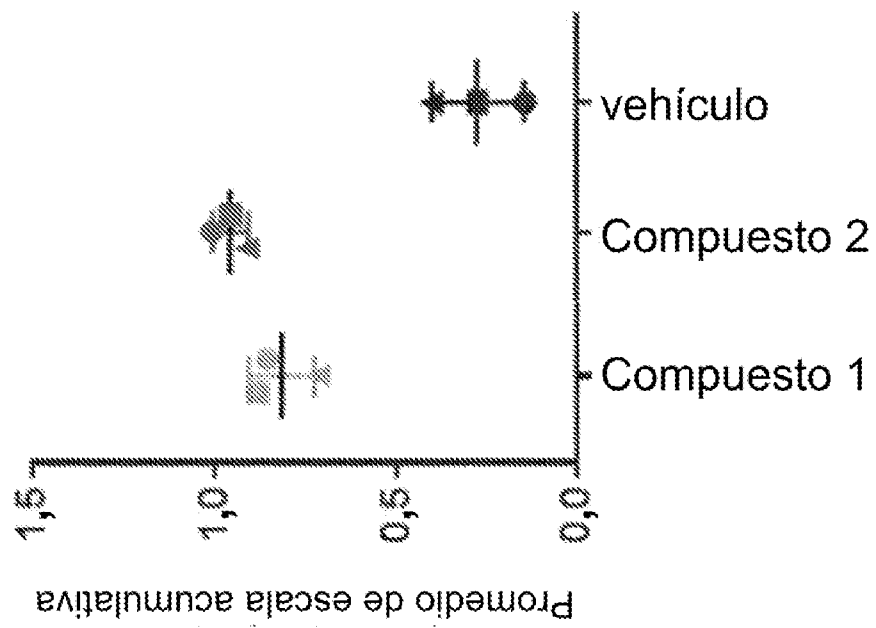
vehículo
Compuesto 2
Compuesto 1

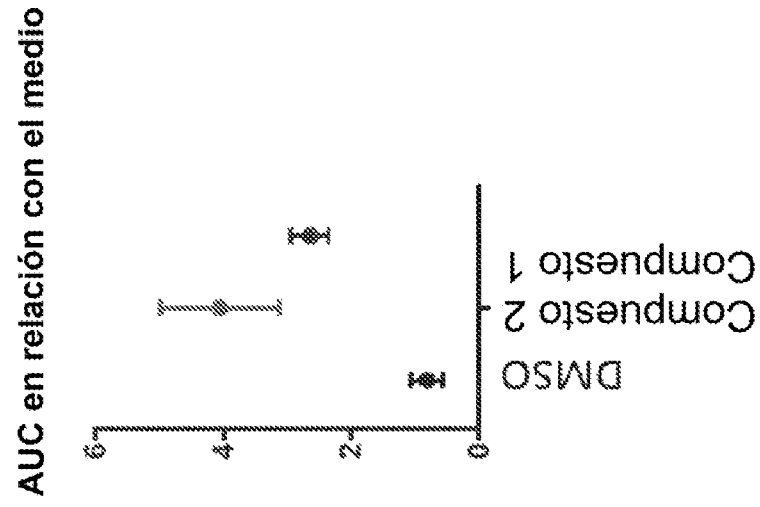
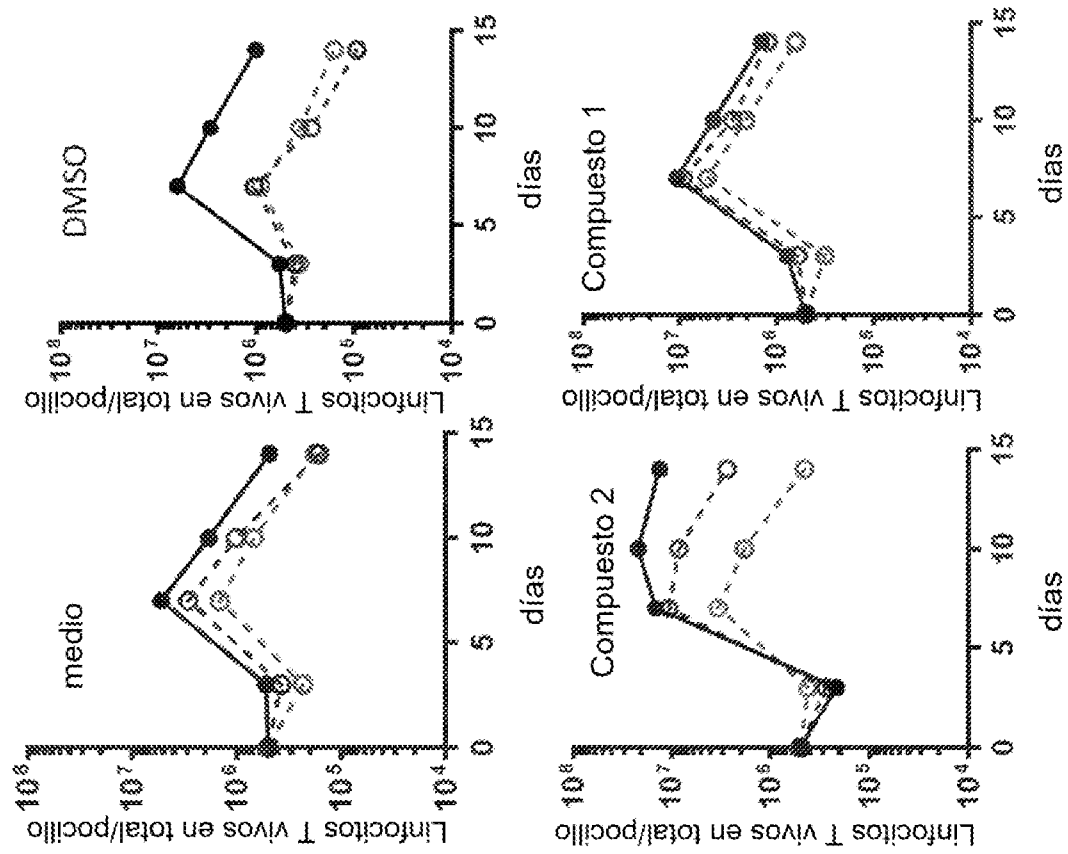
FIG. 24A



vehículo
Compuesto 2
Compuesto 1

FIG. 24B





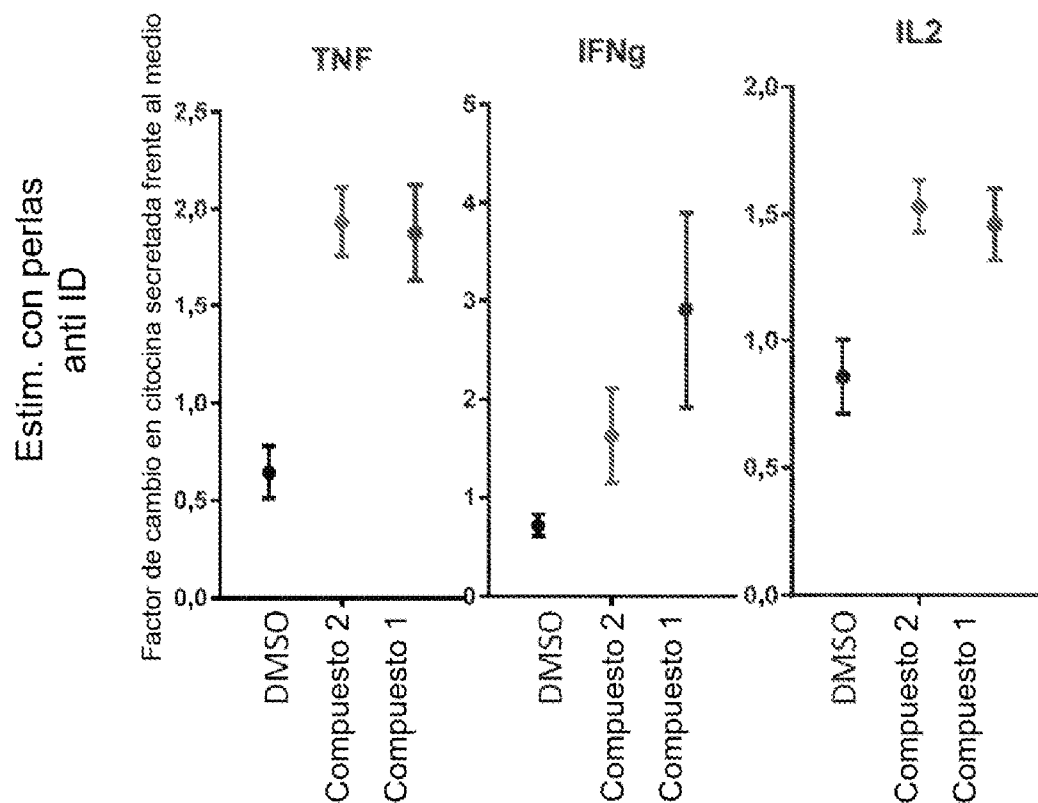


FIG. 25C

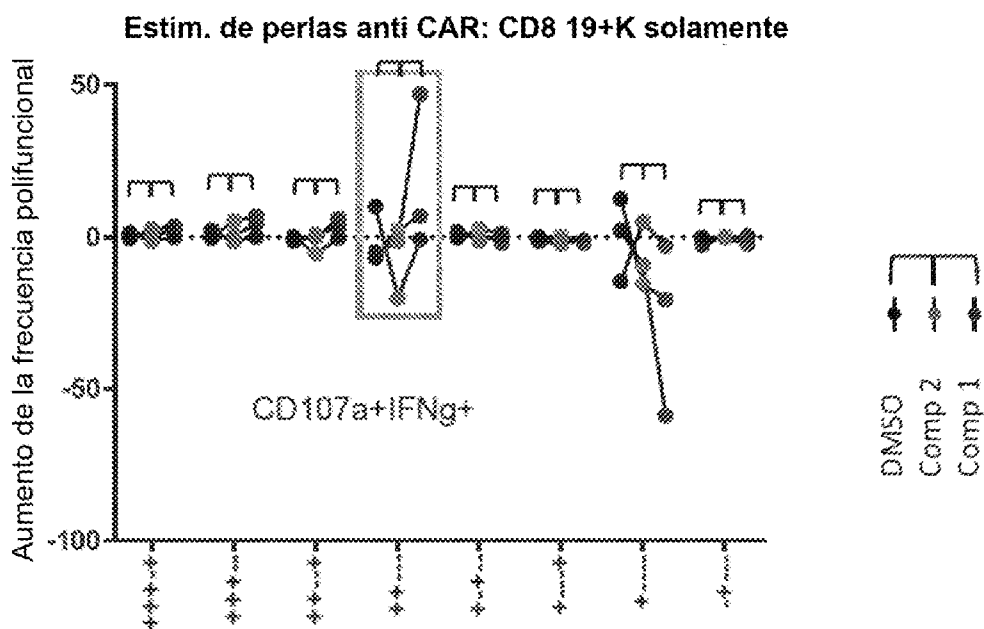


FIG. 25D