

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 986 007**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0783 (2010.01)

C07K 14/05 (2006.01)

A61K 35/17 (2015.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.11.2019 PCT/US2019/063883**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.06.2020 WO20113188**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2019 E 19824223 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2024 EP 3886894**

54 Título: **Métodos para la dosificación y el tratamiento de neoplasias malignas de linfocitos B en terapia celular adoptiva**

30 Prioridad:

30.11.2018 US 201862774168 P

03.12.2018 US 201862774858 P

14.05.2019 US 201962847897 P

30.05.2019 US 201962854957 P

05.11.2019 US 201962931143 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.11.2024

73 Titular/es:

JUNO THERAPEUTICS, INC. (100.0%)

400 Dexter Ave. N Suite 1200

Seattle, WA 98109-4703, US

72 Inventor/es:

GILLENWATER, HEIDI;

ALBERTSON, TINA;

DUBOVSKY, JASON A. y

THORPE, JERILL

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

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

ES 2 986 007 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para la dosificación y el tratamiento de neoplasias malignas de linfocitos B en terapia celular adoptiva

5 **Campo**

La presente divulgación se refiere en algunos aspectos a la terapia celular adoptiva que implica la administración de dosis de células para tratar sujetos con enfermedades y afecciones tales como determinadas neoplasias malignas de linfocitos B, y a métodos, composiciones, usos y artículos de fabricación relacionados. Las células generalmente expresan receptores recombinantes tales como receptores de antígenos quiméricos (CAR). En algunas realizaciones, la enfermedad o afección es una leucemia linfocítica crónica (CLL, por sus siglas en inglés), tal como la CLL recidivante o refractaria. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección es un linfoma linfocítico de células pequeñas (SLL, por sus siglas en inglés). En algunas realizaciones, el sujeto es de un grupo o subconjunto específico de sujetos con CLL o SLL, tales como sujetos muy pretratados o de mal pronóstico.

15 **Antecedentes**

La leucemia linfocítica crónica (y el linfoma linfocítico de células pequeñas) es un cáncer indolente en el que se encuentran linfocitos inmaduros en la sangre y la médula ósea y/o en los ganglios linfáticos. La leucemia linfocítica crónica y el linfoma linfocítico de células pequeñas son la misma enfermedad, pero en la CLL las células cancerosas se encuentran principalmente en la sangre y la médula ósea. En el SLL, las células cancerosas se encuentran principalmente en los ganglios linfáticos. La CLL se considera incurable. Los pacientes con el tiempo recaen o se vuelven refractarios a las terapias disponibles. Los antagonistas de los receptores de linfocitos B han mostrado mejores resultados para los pacientes con CLL recidivante/refractaria, sin embargo, las tasas de remisión completa siguen siendo bajas y los pacientes que progresan durante o después de la terapia tienen malos resultados. Se necesitan terapias eficaces para pacientes con CLL y SLL que han fracasado en la terapia con antagonistas del receptor de linfocitos B. Se proporcionan métodos y usos que satisfacen dichas necesidades. El documento WO 2017/214207 A2 describe métodos para el tratamiento de neoplasias malignas de linfocitos B usando terapia celular adoptiva. El documento WO 2015/157384 A1 describe productos de linfocitos T genomodificados de composición definida.

30 **Sumario**

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Cualquier referencia en el presente documento a métodos de tratamiento pretende referirse a productos para su uso en dichos métodos.

La invención proporciona una primera composición que comprende uno de entre linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ para su uso con una segunda composición que comprende el otro de entre linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ en un método de tratamiento de un sujeto que tiene una leucemia linfocítica crónica (CLL) o linfoma linfocítico de células pequeñas (SLL), en donde el método comprende administrar al sujeto una dosis de linfocitos T modificados por ingeniería genética que comprenden linfocitos T CD4+ y CD8+, que comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR) que se une específicamente a CD19, en donde:

- (i) el sujeto ha recaído después de la remisión después del tratamiento con, se vuelve refractario a o fracasó en el tratamiento con y/o es intolerante a ibrutinib y venetoclax;
- (ii) la administración comprende administrar una pluralidad de composiciones separadas, en donde la pluralidad de composiciones separadas comprende la primera composición que comprende uno de entre linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ y la segunda composición que comprende el otro de entre linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+;
- y
- (iii) la dosis de linfocitos T modificados por ingeniería genética comprende una relación definida de células CD4+ que expresan CAR con respecto a células CD8+ que expresan CAR, opcionalmente en donde la relación es de entre aproximadamente 1:3 y aproximadamente 3:1.

La invención proporciona además una pluralidad de composiciones separadas que comprenden una primera composición que comprende uno de entre linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ y una segunda composición que comprende el otro de entre linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que tiene leucemia linfocítica crónica (CLL) o linfoma linfocítico de células pequeñas (SLL), en donde el método comprende administrar al sujeto una dosis de linfocitos T modificados por ingeniería genética que comprenden linfocitos T CD4+ y CD8+ que comprenden un receptor de antígeno quimérico (CAR) que se une específicamente a CD19, en donde:

- (i) el sujeto ha recaído después de la remisión después del tratamiento con, se vuelve refractario a o fracasó en el tratamiento con y/o es intolerante a ibrutinib y venetoclax;
- (ii) la administración comprende administrar la pluralidad de composiciones separadas, en donde la pluralidad de composiciones separadas comprende la primera composición que comprende uno de entre linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ y la segunda composición que comprende el otro de entre linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+;
- y

(iii) la dosis de linfocitos T modificados por ingeniería genética comprende una relación definida de células CD4⁺ que expresan CAR con respecto a células CD8⁺ que expresan CAR, opcionalmente en donde la relación es de entre aproximadamente 1:3 y aproximadamente 3:1.

5 En algunas realizaciones, la dosis de células o células administradas en relación con cualquier realización de las composiciones proporcionadas para su uso contiene linfocitos T CD4⁺ o un subtipo o fenotipo de los mismos y/o linfocitos T CD8⁺ o un subtipo de los mismos. En algunas realizaciones, las células CD8⁺ o subtipo o fenotipo están presentes a una dosis o cantidad o número particular; en algunas realizaciones, en algunas realizaciones las células CD4⁺ o subtipo o fenotipo están presentes a una dosis o cantidad o número particular. En algunas realizaciones, las
10 células CD8⁺ o subtipo o fenotipo de las mismas y las células CD4⁺ o subtipo o fenotipo de las mismas, se administran en una relación definida, exactamente o aproximadamente 1:1, o entre exactamente o aproximadamente 1:3 y exactamente o aproximadamente 3:1. En algunas realizaciones, la dosis o administración contiene o es de una cantidad o número particular de una población de las células y la relación es una relación definida.

15 En algunas realizaciones, la dosis de linfocitos T modificados por ingeniería genética está enriquecida para linfocitos T humanos primarios CD4⁺ y CD8⁺.

En algunas realizaciones, la dosis de linfocitos T modificados por ingeniería genética comprende de exactamente o aproximadamente $2,5 \times 10^7$ células que expresan CAR totales a exactamente o aproximadamente $1,5 \times 10^8$ células que expresan CAR totales.
20

En algunas realizaciones, la dosis de células enriquecidas en linfocitos T modificados por ingeniería genética CD4⁺ y CD8⁺ comprende más de o más de aproximadamente el 70 %, más de o más de aproximadamente el 75 %, más de o más de aproximadamente el 80 %, más de o más de aproximadamente el 85 %, más de o más de aproximadamente el 90 %, más de o más de aproximadamente el 95 % o más de o más de aproximadamente el 98 % de linfocitos T humanos primarios CD4⁺ y CD8⁺.
25

En algunas realizaciones, la dosis de linfocitos T modificados por ingeniería genética CD4⁺ y CD8⁺ comprende una relación definida de células CD4⁺ que expresan el CAR con respecto a células CD8⁺ que expresan el CAR que es de exactamente o aproximadamente 1:1. En algunas realizaciones, la dosis de linfocitos T modificados por ingeniería genética comprende de exactamente o aproximadamente $2,5 \times 10^7$ células que expresan CAR totales a exactamente o aproximadamente $1,0 \times 10^8$ células que expresan CAR totales. En algunas realizaciones, la dosis de linfocitos T modificados por ingeniería genética comprende exactamente o aproximadamente $2,5 \times 10^7$ células que expresan CAR totales. En algunas realizaciones, la dosis de linfocitos T modificados por ingeniería genética comprende exactamente o aproximadamente 5×10^7 células totales o células que expresan CAR totales. En algunas realizaciones, los linfocitos T modificados por ingeniería genética comprenden exactamente o aproximadamente 1×10^8 células totales o células que expresan CAR totales.
30
35

En algunas realizaciones, el CAR comprendido por los linfocitos T CD4⁺ y/o el CAR comprendido por los linfocitos T CD8⁺ comprenden un CAR que es el mismo y/o en donde los linfocitos T CD4⁺ y/o los linfocitos T CD8⁺ se modifican genéticamente para expresar un CAR que es el mismo.
40

En realizaciones particulares, la primera composición comprende los linfocitos T CD8⁺ y la segunda composición comprende los linfocitos T CD4⁺. En algunas realizaciones, el inicio de la administración de la primera composición se realiza antes del inicio de la administración de la segunda composición.
45

En algunas realizaciones, la administración de la primera composición y la administración de la segunda composición se realizan el mismo día, se realizan con no más de 36 horas de diferencia, no más de 24 horas de diferencia, no más de 12 horas de diferencia, no más de 6 horas de diferencia, no más de 4 horas de diferencia, no más de 2 horas de diferencia, o no más de 1 hora de diferencia o no más de 30 minutos de diferencia. En algunas realizaciones, la administración de la primera composición y la administración de la segunda composición se realizan entre exactamente o aproximadamente 0 y exactamente o aproximadamente 48 horas, entre exactamente o aproximadamente 0 y exactamente o aproximadamente 36 horas, entre exactamente o aproximadamente 0 y exactamente o aproximadamente 24 horas, entre exactamente o aproximadamente 0 y exactamente o aproximadamente 12 horas, entre exactamente o aproximadamente 0 y exactamente o aproximadamente 6 horas, entre exactamente o aproximadamente 0 y exactamente o aproximadamente 2 horas, entre exactamente o aproximadamente 0 y exactamente o aproximadamente 1 hora, entre exactamente o aproximadamente 0 y exactamente o aproximadamente 30 minutos, entre exactamente o aproximadamente 30 minutos y exactamente o aproximadamente 48 horas, entre exactamente o aproximadamente 30 minutos y exactamente o aproximadamente 36 horas, entre exactamente o aproximadamente 30 minutos y exactamente o aproximadamente 24 horas, entre exactamente o aproximadamente 30 minutos y exactamente o aproximadamente 12 horas, entre exactamente o aproximadamente 30 minutos y exactamente o aproximadamente 6 horas, entre exactamente o aproximadamente 30 minutos y exactamente o aproximadamente 4 horas, entre exactamente o aproximadamente 30 minutos y exactamente o aproximadamente 2 horas, entre exactamente o aproximadamente 30 minutos y exactamente o aproximadamente 1 hora, entre exactamente o aproximadamente 1 hora y exactamente o aproximadamente 48 horas, entre exactamente o aproximadamente 1 hora y exactamente o aproximadamente 36 horas, entre exactamente o aproximadamente 1
50
55
60
65

hora y exactamente o aproximadamente 24 horas, entre exactamente o aproximadamente 1 hora y exactamente o aproximadamente 12 horas, entre exactamente o aproximadamente 1 hora y exactamente o aproximadamente 6 horas, entre exactamente o aproximadamente 1 hora y exactamente o aproximadamente 4 horas, entre exactamente o aproximadamente 1 hora y exactamente o aproximadamente 2 horas, entre exactamente o aproximadamente 2 horas y exactamente o aproximadamente 48 horas, entre exactamente o aproximadamente 2 horas y exactamente o aproximadamente 36 horas, entre exactamente o aproximadamente 2 horas y exactamente o aproximadamente 24 horas, entre exactamente o aproximadamente 2 horas y exactamente o aproximadamente 12 horas, entre exactamente o aproximadamente 2 horas y exactamente o aproximadamente 6 horas, entre exactamente o aproximadamente 2 horas y exactamente o aproximadamente 4 horas, entre exactamente o aproximadamente 4 horas y exactamente o aproximadamente 48 horas, entre exactamente o aproximadamente 4 horas y exactamente o aproximadamente 36 horas, entre exactamente o aproximadamente 4 horas y exactamente o aproximadamente 24 horas, entre exactamente o aproximadamente 4 horas y exactamente o aproximadamente 12 horas, entre exactamente o aproximadamente 4 horas y exactamente o aproximadamente 6 horas, entre exactamente o aproximadamente 6 horas y exactamente o aproximadamente 48 horas, entre exactamente o aproximadamente 6 horas y exactamente o aproximadamente 36 horas, entre exactamente o aproximadamente 6 horas y exactamente o aproximadamente 24 horas, entre exactamente o aproximadamente 6 horas y exactamente o aproximadamente 12 horas, entre exactamente o aproximadamente 12 horas y exactamente o aproximadamente 48 horas, entre exactamente o aproximadamente 12 horas y exactamente o aproximadamente 36 horas, entre exactamente o aproximadamente 12 horas y exactamente o aproximadamente 24 horas, entre exactamente o aproximadamente 24 horas y exactamente o aproximadamente 48 horas, entre exactamente o aproximadamente 24 horas y exactamente o aproximadamente 36 horas o entre exactamente o aproximadamente 36 horas y exactamente o aproximadamente 48 horas.

En algunas realizaciones, la administración de la primera composición y la administración de la segunda composición se realizan el mismo día, se realizan con entre aproximadamente 0 y aproximadamente 12 horas de diferencia, entre aproximadamente 0 y aproximadamente 6 horas de diferencia o entre aproximadamente 0 a 2 horas de diferencia; o el inicio de la administración de la primera composición y el inicio de la administración de la segunda composición se realizan con entre aproximadamente 1 minuto y aproximadamente 1 hora de diferencia o entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 30 minutos de diferencia. En algunas realizaciones, la primera composición y la segunda composición se administran con no más de 2 horas, no más de 1 hora, no más de 30 minutos, no más de 15 minutos, no más de 10 minutos o no más de 5 minutos de diferencia.

En algunas realizaciones, la primera composición y la segunda composición se administran con no más de 2 horas, no más de 1 hora, no más de 30 minutos, no más de 15 minutos, no más de 10 minutos o no más de 5 minutos de diferencia.

En algunas realizaciones de cualquiera de las composiciones proporcionadas para su uso, el sujeto tiene CLL o se sospecha que tiene CLL; o el sujeto se identifica o se selecciona como que tiene CLL. En algunas realizaciones, la CLL es una CLL recidivante o refractaria.

En algunas realizaciones, el sujeto tiene SLL o se sospecha que tiene SLL; o el sujeto se identifica o se selecciona como que tiene SLL. En algunas realizaciones, el SLL es un SLL recidivante o refractario.

En algunas realizaciones, antes de la administración de la dosis de linfocitos T modificados por ingeniería genética, el sujeto ha sido tratado con una o más terapias anteriores para la CLL o el SLL, distinta de otra dosis de células que expresan CAR o una terapia de agotamiento linfóide. En algunas realizaciones, la una o más terapias anteriores comprenden al menos dos terapias anteriores, opcionalmente tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o más.

En algunas realizaciones, exactamente o inmediatamente antes del momento de la administración de la dosis de células, el sujeto ha recaído después de la remisión después del tratamiento con, o se volvió refractario a, fracasó en y/o fue intolerante al tratamiento con la una o más terapias anteriores para la CLL o el SLL. En la invención, el sujeto ha recaído después de la remisión después del tratamiento con, o se volvió refractario a, fracasó en y/o fue intolerante al tratamiento con dos o más terapias anteriores que comprendían ibrutinib y venetoclax. En algunas realizaciones, exactamente o inmediatamente antes del momento de la administración de la dosis de células, el sujeto ha recaído después de la remisión después del tratamiento con, o se volvió refractario a, fracasó en y/o fue intolerante al tratamiento con tres o más terapias anteriores. En algunas realizaciones, las terapias anteriores se seleccionan de un inhibidor de cinasas, opcionalmente un inhibidor de la tirosina cinasa de Bruton (BTK); una terapia de combinación que comprende fludarabina y rituximab; radioterapia; y trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT, por sus siglas en inglés).

En algunas realizaciones, en el momento o antes de la administración de la dosis de células: el sujeto tiene o se ha identificado que tiene una o más anomalías citogenéticas, opcionalmente asociadas a CLL de riesgo alto, opcionalmente seleccionadas de entre: cariotipo complejo o anomalías citogenéticas, del 17p, gen de IGVH sin mutación y mutación de TP53; el sujeto tiene o se ha identificado que tiene CLL de riesgo alto.

En algunas realizaciones, el sujeto tiene o se ha identificado como que tiene un estado ECOG de 0 o 1; y/o el sujeto

no tiene un estado ECOG de >1. En algunas realizaciones, en el momento o inmediatamente antes de la administración de la dosis de células modificadas por ingeniería genética o la terapia de agotamiento linfóide, el sujeto no tiene una transformación de Richter de la CLL o el SLL.

- 5 En algunas realizaciones, el sujeto es un adulto y/o tiene más de 50, 60 o 70 años de edad o aproximadamente.

En algunas realizaciones, los linfocitos T son linfocitos T primarios obtenidos de un sujeto. En algunas realizaciones, los linfocitos T son autólogos al sujeto. En algunas realizaciones, la dosis de células modificadas por ingeniería genética son células viables.

- 10 En algunas realizaciones, antes de la administración de la dosis de células modificadas por ingeniería genética, se administra terapia de agotamiento linfóide al sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto se ha precondicionado con una terapia de agotamiento linfóide. En alguna realización, la terapia de agotamiento linfóide comprende la administración de fludarabina y/o ciclofosfamida. En algunas realizaciones, la terapia de agotamiento linfóide comprende la administración de ciclofosfamida a aproximadamente 200-400 mg/m², opcionalmente a exactamente o aproximadamente 300 mg/m², inclusive, y/o fludarabina a aproximadamente 20-40 mg/m², opcionalmente 30 mg/m², diariamente durante 2-4 días, opcionalmente durante 3 días. En algunas realizaciones, la terapia de agotamiento linfóide comprende la administración de ciclofosfamida a exactamente o aproximadamente 300 mg/m² y fludarabina a aproximadamente 30 mg/m² diariamente durante 3 días, opcionalmente en donde la dosis de células se administra al menos exactamente o aproximadamente 2-7 días después de la terapia de agotamiento linfóide o al menos exactamente o aproximadamente 2-7 días después del inicio de la terapia de agotamiento linfóide.

- 25 En algunas realizaciones, en el momento o antes de la administración de la dosis de células: el sujeto tiene o se ha identificado que tiene una o más anomalías citogenéticas, opcionalmente asociadas a CLL o SLL de riesgo alto, opcionalmente seleccionadas de entre: cariotipo complejo o anomalías citogenéticas, del 17p, gen de IGVH sin mutación y mutación de TP53; y/o el sujeto es o se ha identificado como que tiene CLL o SLL de riesgo alto. En algunas realizaciones, exactamente o inmediatamente antes del momento de la administración de la dosis de células, el sujeto ha recaído después de la remisión después del tratamiento con, o se volvió refractario a, fracasó en y/o fue intolerante al tratamiento con dos o más terapias anteriores. En algunas realizaciones, en el momento o antes de la administración de la dosis de células, el sujeto es o se ha identificado como que tiene una CLL o un SLL de riesgo normal. En algunas realizaciones, exactamente o inmediatamente antes del momento de la administración de la dosis de células, el sujeto ha recaído después de la remisión después del tratamiento con, o se volvió refractario a, fracasó en y/o fue intolerante al tratamiento con tres o más terapias anteriores. En algunas realizaciones, en el momento o antes de la administración de la dosis de células, el sujeto es o se ha identificado como intolerante a un inhibidor de la tirosina cinasa de Bruton (BTK) y ha recibido un inhibidor de BTK durante una duración de menos de exactamente o aproximadamente 6 meses, y/o no es elegible para el tratamiento con un inhibidor de BTK.

- 40 En algunas realizaciones, (i) el sujeto es o se ha identificado como que tiene CLL o SLL de riesgo alto, y exactamente o inmediatamente antes del momento de la administración de la dosis de células, el sujeto ha recaído después de la remisión después del tratamiento con, o se volvió refractario a, fracasó en y/o fue intolerante al tratamiento con una o más terapias distintas del inhibidor de BTK; o (ii) el sujeto es o se ha identificado como que tiene una CLL o un SLL de riesgo normal, y exactamente o inmediatamente antes del momento de la administración de la dosis de células, el sujeto ha recaído después de la remisión después del tratamiento con, o se volvió refractario a, fracasó en y/o fue intolerante al tratamiento con dos o más terapias anteriores distintas del inhibidor de BTK.

- 45 En algunas realizaciones, la administración de la dosis de células y/o la terapia de agotamiento linfóide se realiza a través de suministro ambulatorio. En algunas realizaciones, la dosis de células se administra por vía parenteral, opcionalmente por vía intravenosa.

- 50 En algunas realizaciones, la respuesta en al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 50%, al menos el 60 % o al menos el 70 % de los sujetos tratados está en remisión completa (CR, por sus siglas en inglés) en los sujetos tratados de acuerdo con el método. En algunas realizaciones, la duración de la respuesta hasta la progresión es duradera durante más de 3 meses o más de 6 meses. En algunas realizaciones, en los sujetos tratados de acuerdo con el método, más del 50 %, más del 60 % o más del 70 % tenían una enfermedad residual mínima (MRD, por sus siglas en inglés) indetectable durante al menos un mes, al menos dos meses, al menos tres meses o al menos 6 meses después de administrar la dosis de células.

- 60 En algunas realizaciones, de los sujetos tratados de acuerdo con el método, no más del 10 % de los sujetos presentan un síndrome de liberación de citocinas (CRS, por sus siglas en inglés) superior al grado 2. En algunas realizaciones, de una pluralidad de sujetos tratados de acuerdo con el método, no más del 10 %, no más del 20%, no más del 30 % o no más del 40 % de los sujetos presentan una neurotoxicidad superior al grado 2.

- 65 En algunas realizaciones, el CAR comprende un dominio de unión a antígeno extracelular específico para CD 19, un dominio transmembrana, un dominio de señalización citoplasmático derivado de una molécula coestimuladora, que opcionalmente es un BB 4-1, y un dominio de señalización citoplasmático derivado de una molécula que contiene ITAM de señalización primaria, que opcionalmente es un CD3zeta; el CAR comprende, en orden, un dominio de unión

a antígeno extracelular específico para CD 19, un dominio transmembrana, un dominio de señalización citoplasmático derivado de una molécula coestimuladora y un dominio de señalización citoplasmático derivado de una molécula que contiene ITAM de señalización primaria.

5 En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno es un scFv.

En algunas realizaciones, el scFv comprende una secuencia de CDRL1 de RASQDISKYLN (SEQ ID NO: 35), una secuencia de CDRL2 de SRLHSGV (SEQ ID NO: 36) y/o una secuencia de CDRL3 de GNTLPYTFG (SEQ ID NO: 37) y/o una secuencia de CDRH1 de DYGVN (SEQ ID NO: 38), una secuencia de CDRH2 de VIWGSETTYNSALKS (SEQ ID NO: 39) y/o una secuencia de CDRH3 de YAMDYWG (SEQ ID NO: 40); el scFv comprende una región de cadena pesada variable de FMC63 y una región de cadena ligera variable de FMC63 y/o una secuencia de CDRL1 de FMC63, una secuencia de CDRL2 de FMC63, una secuencia de CDRL3 de FMC63, una secuencia de CDRH1 de FMC63, una secuencia de CDRH2 de FMC63 y una secuencia de CDRH3 de FMC63 o se une al mismo epítipo o compete por la unión a cualquiera de los anteriores; el scFv comprende un VH expuesto en la SEQ ID NO: 41 y un VL expuesto en la SEQ ID NO: 42, opcionalmente en donde el VH y el VL están separados por un enlazador flexible, opcionalmente en donde el enlazador flexible es o comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 24; y/o el scFv es o comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 43.

En algunas realizaciones, la región de señalización coestimuladora es un dominio de señalización de CD28 o 4-1BB.
20 En algunas realizaciones, la región de señalización coestimuladora es un dominio de señalización de 4-1BB.

En algunas realizaciones, el dominio coestimulador comprende la SEQ ID NO: 12 o una variante de la misma que tiene al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con la misma. En algunas realizaciones, el dominio de señalización primario es un dominio de señalización CD3zeta. En algunas realizaciones, el dominio de señalización primario comprende la SEQ ID NO: 13 o 14 o 15 que tiene al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con la misma.

En algunas realizaciones, el CAR comprende además un espaciador entre el dominio transmembrana y el scFv. En algunas realizaciones, el espaciador es un espaciador polipeptídico que comprende o consiste en toda o una porción de una bisagra de inmunoglobulina o una versión modificada de la misma, opcionalmente, una bisagra de IgG4 o una versión modificada de la misma. En algunas realizaciones, el espaciador tiene aproximadamente 15 aminoácidos o menos, y no comprende una región extracelular de CD28 o una región extracelular de CD8. En algunas realizaciones, el espaciador tiene exactamente o aproximadamente 12 aminoácidos de longitud.

En algunas realizaciones, el espaciador tiene o consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 1, una secuencia codificada por la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, o una variante de cualquiera de las anteriores que tenga al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con las mismas; y/o comprende o consiste en la fórmula X_1PPX_2P , donde X_1 es glicina, cisteína o arginina y X_2 es cisteína o treonina.

En algunas de cualquiera de las realizaciones, el sujeto es un sujeto humano.

Breve descripción de los dibujos

45 La **FIG. 1** muestra un gráfico de cajas de la frecuencia de linfocitos T CAR en sangre completa medida mediante citometría de flujo. Las cajas se extienden del 1.^{er} al 3.^{er} cuartil, la mediana se muestra como una línea horizontal. Los bigotes se extienden hasta 1,5 veces el intervalo intercuartílico, con mediciones fuera de este intervalo trazadas como puntos individuales.

50 La **FIG. 2** muestra un gráfico de la mediana de células/μl a lo largo del tiempo por nivel de dosis. Pacientes, N = 16; muestras, n. La barra de error superior representa el tercer cuartil; la barra de error inferior representa el primer cuartil. La dosis se administró el día 1.

La **FIG. 3A** y la **FIG. 3B** muestran gráficos del análisis de biomarcadores de IL-16 y TNFα en pacientes a lo largo del tiempo. Pacientes, N = 13. Se analizaron treinta y nueve citocinas en 13 pacientes dentro de los primeros treinta días de tratamiento.

55 La **FIG. 4A** muestran los resultados de la mejor respuesta global en sujetos con CLL R/R (N = 22) a los que se les administraron linfocitos T CAR+ anti-CD19 al ND1 (5×10^7 linfocitos T que expresan CAR) o ND2 (1×10^8 linfocitos T que expresan CAR). **FIG. 4B** muestra resultados de enfermedad residual mínima indetectable (uMRD, por sus siglas en inglés) en sangre mediante citometría de flujo o en médula ósea mediante secuenciación de última generación (NGS, por sus siglas en inglés) en cualquier punto temporal después de la administración a sujetos con CLL R/R de linfocitos T que expresan CAR anti-CD19 al ND1 (5×10^7 linfocitos T que expresan CAR) o ND2 (1×10^8 linfocitos T que expresan CAR).

60 La **FIG. 5** muestra un gráfico de nadador de la duración de la respuesta a lo largo del tiempo en sujetos con CLL R/R (N = 22) a los que se les administraron linfocitos T CAR+ anti-CD19 al ND1 (5×10^7 linfocitos T que expresan CAR) o ND2 (1×10^8 linfocitos T que expresan CAR).

65 La **FIG. 6** muestra un gráfico de la mediana de células/μl a lo largo del tiempo por niveles de dosis en sujetos con

CLL R/R a los que se les administraron linfocitos T CAR+ anti-CD19 al ND1 (5×10^7 linfocitos T que expresan CAR) o ND2 (1×10^8 linfocitos T que expresan CAR). La barra de error superior representa el tercer cuartil, la barra de error inferior representa el primer cuartil. La dosis de linfocitos T CAR+ anti-CD19 se administró el día 1.

La **FIG. 7A** muestran resultados de la mejor respuesta global en sujetos con CLL R/R (N = 22) o sujetos que han fracasado en el tratamiento anterior tanto con un inhibidor de la tirosina cinasa de Bruton (BTKi) como con venetoclax (N = 9). La **FIG. 7B** muestra resultados de enfermedad residual mínima indetectable (uMRD) en sangre mediante citometría de flujo o en médula ósea mediante secuenciación de última generación (NGS) en cualquier punto temporal después de la administración en sujetos con CLL R/R (N = 20) o sujetos que han fracasado en el tratamiento anterior con BTKi y venetoclax (N = 8). ^aEvaluable para respuesta se definió como que tiene una evaluación pretratamiento y ≥ 1 evaluación posterior al momento basal; evaluable para MRD se definió como pacientes con MRD detectable en el momento basal. Un sujeto no fue evaluable para respuesta. ^bFracaso de Venetoclax definido como interrupción debida a PD o <PR después de ≥ 3 meses de terapia. ^cDos sujetos no fueron evaluables para MRD. ^dUn sujeto no fue evaluable para MRD. IC, intervalo de confianza; CRi, respuesta completa con recuperación incompleta del hemograma; NGS, secuenciación de última generación; nPR, respuesta parcial nodular; PD, enfermedad progresiva; PR, respuesta parcial; SD, enfermedad estable; uMRD, enfermedad residual mínima indetectable.

La **FIG. 8** muestra un gráfico de nadador de la duración de la respuesta a lo largo del tiempo en sujetos individuales con CLL R/R que han fracasado en el tratamiento anterior tanto con un BTKi como con venetoclax, y los otros sujetos tratados. *MRD no evaluable. Hubo 7 muertes durante el estudio: 5 sujetos murieron por progresión de la enfermedad; 1 sujeto tuvo insuficiencia respiratoria de grado 5 (ND1) no relacionada con el tratamiento con terapia de linfocitos T CAR+; 1 sujeto tuvo choque séptico, lesión renal aguda y neumonía (ND2), no relacionados con el tratamiento con terapia de linfocitos T CAR+. No se produjeron muertes en los primeros 30 días. ND, no realizado; RT, Transformación de Richter.

La **FIG. 9** muestra un gráfico de la mediana de células/ μ l a lo largo del tiempo por niveles de dosis en sujetos tratados evaluables y sujetos que han fracasado en el tratamiento anterior tanto con un BTKi como con venetoclax. La barra de error superior representa el tercer cuartil, La barra de error inferior representa el primer cuartil. La terapia de linfocitos T CAR+ se administró el Día 1. AUC₀₋₂₉, área bajo la curva de los días 0 a 29; C_{máx}, concentración máxima; PK/PD, farmacocinética/farmacodinámica; Q, cuartil; T_{máx}, tiempo hasta la concentración máxima.

Descripción detallada

Las realizaciones de la invención caen dentro de algunos de los casos que se divulgan a continuación. 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 métodos y usos de células modificadas por ingeniería genética (por ejemplo, linfocitos T) y/o composiciones de las mismas, para el tratamiento de sujetos que tienen una enfermedad o afección, que generalmente es o incluye un cáncer o un tumor, tal como una leucemia o un linfoma, más particularmente leucemia linfocítica crónica (CLL) o linfoma linfocítico de células pequeñas (SLL). En algunas divulgaciones, los métodos y usos proporcionan o consiguen una respuesta mejorada y/o respuestas o una eficacia más duraderas y/o un riesgo reducido de toxicidad u otros efectos secundarios, por ejemplo, en grupos particulares de sujetos tratados, en comparación con determinados métodos alternativos. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos son ventajosos en virtud de la administración de números específicos o números relativos de las células modificadas por ingeniería genética, la administración de relaciones definidas de tipos particulares de las células, el tratamiento de poblaciones de pacientes particulares, tales como aquellos que tienen un perfil de riesgo particular, la estadificación y/o los antecedentes de tratamientos anteriores y/o combinaciones de los mismos.

También se divulgan métodos que incluyen evaluar parámetros particulares, por ejemplo, la expresión de biomarcadores o analitos específicos, que pueden correlacionarse con el desarrollo de toxicidad, y métodos de tratamiento, por ejemplo, terapia de intervención, para prevenir y/o mejorar toxicidades. También se divulgan métodos que implican evaluar parámetros particulares, por ejemplo, la expresión de biomarcadores o analitos específicos, que puede correlacionarse con un resultado, tal como un resultado terapéutico, incluyendo una respuesta, tal como una respuesta completa (CR) o una respuesta parcial (PR); o un resultado de seguridad, tal como el desarrollo de una toxicidad, por ejemplo, neurotoxicidad o CRS, después de la administración de una inmunoterapia y/o terapia celular. También se divulgan métodos para evaluar la probabilidad de respuesta y/o probabilidad de riesgo de toxicidad, basándose en la evaluación de los parámetros, tales como la expresión de biomarcadores o analitos. También se divulgan composiciones para su uso en terapia celular. También se divulgan artículos de fabricación y kits, por ejemplo, para su uso en los métodos que se divulgan en el presente documento. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los artículos de fabricación y los kits contienen opcionalmente instrucciones de uso, de acuerdo con los métodos que se divulgan en el presente documento.

En particular, entre los casos que se divulgan en el presente documento existen métodos de tratamiento de sujetos con CLL o SLL. En algunas divulgaciones, la CLL se considera una enfermedad incurable, y los sujetos en última instancia recaen o se vuelven refractarios a las terapias o tratamientos disponibles. En algunos de cualesquier casos que se divulgan en el presente documento, los sujetos tienen una enfermedad de riesgo alto. En algunos casos que

se divulgan en el presente documento, los sujetos tienen una CLL o SLL de riesgo alto. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las estrategias de tratamiento existentes para sujetos de alto y riesgo muy alto pueden incluir fludarabina, ciclofosfamida y rituximab (FCR), inhibidores de la tirosina cinasa de Bruton (BTK) (por ejemplo, ibrutinib) y/o trasplante alógeno de células madre. (Puiggros *et al.*, *BioMed Research International*, Volumen 2014 (2014), ID de artículo 435983). Muchas de las terapias existentes incluyen fármacos dirigidos por vía oral, que tienen, para algunos pacientes con CLL, mejores resultados de tratamiento. No obstante, algunos pacientes se muestran intolerantes o resistentes a la terapia y/o no consiguen una respuesta completa con MRD indetectable (uMRD). En algunas divulgaciones, los sujetos que tienen una enfermedad progresiva después del tratamiento con las terapias disponibles tienen malos resultados. Por ejemplo, en algunas divulgaciones, los sujetos tratados para la CLL presentan malos resultados a largo plazo. Por ejemplo, en algunos casos que se divulgan en el presente documento, los sujetos con CLL de riesgo alto refractaria (R/R) presentan una supervivencia escasa después de la interrupción de ibrutinib (Jain *et al.* (2015) *Blood* 125(13):2062-2067). Existe la necesidad de métodos mejorados de tratamiento de la CLL y, en algunas divulgaciones, de aquellos adecuados para tratar la CLL de riesgo alto y/o muy alto y/o a sujetos que han recaído o se han vuelto refractarios a múltiples terapias anteriores.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos incluyen la administración de células a un sujeto seleccionado o identificado como que tiene un determinado pronóstico o riesgo de CLL. La leucemia linfocítica crónica (CLL) es una enfermedad generalmente variable. Algunos sujetos con CLL pueden sobrevivir sin tratamiento, mientras que otros pueden requerir una intervención inmediata. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los sujetos con CLL pueden clasificarse en grupos que pueden informar del pronóstico de la enfermedad y/o la estrategia de tratamiento recomendada. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, estos grupos pueden ser de "riesgo bajo", "riesgo intermedio", "riesgo alto", y/o "riesgo muy alto" y los pacientes pueden clasificarse de esta manera dependiendo de una serie de factores que incluyen, pero sin limitación, anomalías genéticas y/o características morfológicas o físicas. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los sujetos tratados de acuerdo con el método se clasifican o identifican basándose en el riesgo de CLL. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el sujeto es uno que tiene CLL de riesgo alto.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos y usos que se divulgan proporcionan o consiguen respuestas o eficacia mejoradas o más duraderas en comparación con determinados métodos alternativos, tal como en grupos particulares de sujetos tratados, tal como en pacientes con leucemia, tal como CLL o SLL, incluyendo aquellos con enfermedad de riesgo alto. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos son ventajosos en virtud de la administración de una terapia de linfocitos T, tal como una composición que incluye células para una terapia celular adoptiva, por ejemplo, tales como linfocitos T que expresan CAR, por ejemplo, linfocitos T CAR+ anti-CD19. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos también incluyen, antes de la terapia de linfocitos T, una terapia de agotamiento linfóide, por ejemplo, tal como ciclofosfamida, fludarabina o combinaciones de las mismas.

En algunos casos, las divulgaciones se basan en observaciones, tales como aquellas que se describen en los Ejemplos que se divulgan en el presente documento, de que los métodos que se divulgan pueden usarse para conseguir una tasa de respuesta alta con durabilidad alta, en comparación con determinados métodos disponibles para la terapia celular, sin un riesgo aumentado de toxicidad. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos que se divulgan permiten una persistencia prolongada de células transferidas adoptivamente para terapia celular y/o una tasa baja de desarrollo de toxicidad en el sujeto. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos pueden usarse para seleccionar sujetos para el tratamiento con terapia celular que es probable o más probable que respondan a la terapia y/o para determinar las dosis o la pauta posológica adecuadas para una tasa de respuesta más alta y/o una respuesta más duradera, minimizando al mismo tiempo el riesgo de toxicidad. Dichos métodos pueden informar de estrategias racionales para facilitar la aplicación clínica segura y eficaz de la terapia celular adoptiva, tal como la terapia de linfocitos T-CAR.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos que se divulgan consiguen una tasa de respuesta alta en una población muy pretratada de sujetos con CLL de riesgo alto (o SLL), todos los cuales han recibido una o más terapias anteriores, incluyendo ibrutinib. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los sujetos tratados incluyen sujetos que han recaído después de la remisión inicial con ibrutinib o que son refractarios o intolerantes al tratamiento con ibrutinib. En casos particulares que se divulgan en el presente documento, los sujetos tratados incluyen sujetos que han recaído después de la remisión o son refractarios o intolerantes a una o más terapias anteriores adicionales además de ibrutinib, tales como 1, 2, 3, 4, 5 o más terapias anteriores. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los sujetos han recaído o son refractarios a un tratamiento anterior de ibrutinib y venetoclax. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los sujetos que son refractarios a dicho tratamiento han tenido progresión de la enfermedad después de una o más terapias anteriores. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los sujetos tratados, incluyendo aquellos tratados con una o más terapias anteriores (por ejemplo, ibrutinib y/o venetoclax), incluyen aquellos con una citogenética de riesgo alto, incluyendo la mutación TP53, cariotipo complejo (es decir, al menos tres alteraciones cromosómicas) y del17(p). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los sujetos para el tratamiento de acuerdo con los casos que se divulgan en el presente documento incluyen sujetos que han fracasado tanto con un inhibidor de BTK (por ejemplo, ibrutinib) como con venetoclax. Como se demuestra en el presente documento, los resultados de un ensayo clínico en curso demuestran una tasa de respuesta global (ORR, por sus siglas en inglés)

alta de más del 65 % de los sujetos tratados en todos los niveles de dosis, incluyendo la remisión completa (CR) con recuperación incompleta del hemograma (CRi) en más del 35 % de los sujetos tratados. De dichos sujetos, todos han sido tratados anteriormente con ibrutinib y aproximadamente la mitad han sido tratados anteriormente con ibrutinib y venetoclax. En algunas divulgaciones, los resultados se asocian a la consecución de MRD indetectable (uMRD); se ha publicado que la consecución de uMRD se correlaciona con mejores resultados (Kovacs *et al.* (2016) *J. Clin. Oncol.*, 34:3758-3765; Thompson y Wierda (2016) *Blood*, 127:279-286). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos que se divulgan dan como resultado un porcentaje alto de respuestas sostenidas que continúan sin progresión durante más de 1 mes, más de 3 meses, más de seis meses o más.

Dichos resultados conseguidos en sujetos de riesgo alto son superiores en comparación con otras terapias alternativas determinadas. En particular, generalmente se considera que la CLL es incurable y los pacientes con frecuencia recaen o se vuelven refractarios a las terapias disponibles en última instancia (Dighiero y Hamblin (2008) *The Lancet*, 371:1017-1029). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la CR y la uMRD son inadecuadas y/o los sujetos tienen progresión de la enfermedad o malos resultados después del tratamiento con otros agentes determinados, tales como ibrutinib de agente único, venetoclax-Rituximab, Bendamustina-Rituximab o tanto ibrutinib como venetoclax. Además, los informes han indicado que otras terapias de linfocitos T CAR determinadas pueden no conseguir dichas tasas de respuesta duraderas.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos y usos incluyen administrar al sujeto células que expresan receptores de superficie celular modificados genéticamente (recombinantes) en terapia celular adoptiva, que generalmente son receptores quiméricos tales como receptores de antígenos quiméricos (CAR), que reconocen un antígeno expresado por, asociado a y/o específico de la leucemia o linfoma y/o tipo celular del que deriva. En casos particulares que se divulgan en el presente documento, el antígeno diana es CLL. Las células se administran generalmente en una composición formulada para la administración; los métodos generalmente implican administrar una o más dosis de las células al sujeto, una o más dosis que pueden incluir un número particular o número relativo de células o de las células modificadas por ingeniería genética y/o una relación definida o composiciones de dos o más subtipos dentro de la composición, tales como linfocito T CD4 frente a CD8.

En casos particulares que se divulgan en el presente documento, los métodos se realizan con un producto de linfocitos T terapéutico que implica la administración separada de composiciones de linfocitos T CAR CD4+ y CD8+ administradas en un número particular o preciso como una dosis plana y/o como una relación definida de linfocitos T CAR CD4+ y CD8+. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos incluyen producir o modificar por ingeniería genética la composición de linfocitos T CAR mediante un proceso que incluye el aislamiento, selección o enriquecimiento por separado de linfocitos T CD4+ y CD8+ de una muestra biológica. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos para producir una composición de linfocitos T-CAR que incluyen el enriquecimiento de linfocitos T CD4+ y CD8+ evitan el riesgo de incluir células tumorales en el producto de linfocitos T-CAR o durante la fabricación del producto de linfocitos T-CAR. En comparación con otras enfermedades, la CLL es un cáncer en el que las células tumorales se encuentran en la periferia, lo que, en algunos contextos, puede interferir con y/o repercutir en la eficacia de un producto de T-CAR que puede incluir dichas células o puede derivar de una composición inicial que contiene dichas células.

Los encabezamientos de sección utilizados en el presente documento tienen fines organizativos únicamente y no deben considerarse limitantes de la materia objeto que se describe.

I. MÉTODOS Y USOS DE LA TERAPIA CELULAR CON CÉLULAS MODIFICADAS GENÉTICAMENTE

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos y usos que se divulgan en el presente documento incluyen administrar al sujeto células que expresan receptores de superficie celular modificados genéticamente (recombinantes) en terapia celular adoptiva, que generalmente son receptores quiméricos tales como receptores de antígenos quiméricos (CAR), que reconocen un antígeno expresado por, asociado a y/o específico de la leucemia o linfoma y/o tipo celular del que deriva. Las células se administran generalmente en una composición formulada para la administración; los métodos generalmente implican administrar una o más dosis de las células al sujeto, una o más dosis que pueden incluir un número particular o número relativo de células o de las células modificadas por ingeniería genética y/o una relación definida o composiciones de dos o más subtipos dentro de la composición, tales como linfocitos T CD4 frente a CD8.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células, poblaciones y composiciones se administran a un sujeto que tiene la enfermedad o afección particular que se ha de tratar, por ejemplo, a través de terapia celular adoptiva, tal como terapia adoptiva de linfocitos T. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos implican tratar a un sujeto que tiene un linfoma o una leucemia, tal como una leucemia linfocítica crónica (CLL) o un linfoma linfocítico de células pequeñas (SLL) con una dosis de células que expresan receptores de antígenos (por ejemplo, células que expresan CAR).

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos que se divulgan implican tratar a un grupo o subconjunto específico de sujetos, por ejemplo, sujetos identificados como que tienen una enfermedad de riesgo alto, por ejemplo, CLL de riesgo alto. En algunas divulgaciones, los métodos tratan a sujetos que tienen una forma de

CLL agresiva y/o de mal pronóstico, tal como una CLL que ha recaído o es refractaria (R/R) a la terapia convencional y tiene un mal pronóstico. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el sujeto ha fracasado en una o más terapias anteriores. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el sujeto no es elegible para otra terapia anterior. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el sujeto ha fracasado en una terapia anterior con un inhibidor de la tirosina cinasa de Bruton (BTKi), tal como ibrutinib. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el sujeto ha fracasado con ibrutinib y venetoclax. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la tasa de respuesta global (ORR; también conocida en algunos casos como tasa de respuesta objetiva) a las terapias disponibles, a un tratamiento de referencia o a una terapia de referencia para la enfermedad y/o población de pacientes para la que está indicada la terapia, es inferior al 40 % y/o la respuesta completa (CR; también conocida en algunos casos como remisión completa) es inferior al 20 %.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos, usos y artículos de fabricación implican, o se usan para el tratamiento de sujetos que implican, seleccionar o identificar un grupo o subconjunto particular de sujetos, por ejemplo, basándose en tipos específicos de enfermedad, criterios de diagnóstico, tratamientos anteriores y/o respuesta a tratamientos anteriores. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos implican tratar a un sujeto que ha recaído después de la remisión después del tratamiento con, o se volvió refractario a, una o más terapias anteriores; o a un sujeto que ha recaído o es refractario (R/R) a una o más terapias anteriores, por ejemplo, una o más líneas de terapia convencional. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos implican tratar a sujetos que tienen leucemia linfocítica crónica. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos implican tratar a sujetos que tienen linfoma linfocítico de células pequeñas. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos implican tratar a un sujeto que tiene un Estado de Desempeño del Grupo Oncológico Cooperativo del Este (ECOG) de 0-1. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos tratan a una población de pacientes con CLL de mal pronóstico o a un sujeto de la misma que generalmente responde mal a terapias o terapias de referencia particulares, tal como una que tiene citogenética de riesgo alto (es decir, Del(17p), mutación TP53, IGHV mutado y cariotipo complejo).

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el receptor de antígeno (por ejemplo, CAR) se une específicamente a un antígeno diana asociado a la enfermedad o afección, tal como asociado a la CLL. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el receptor de antígeno se une a un antígeno diana asociado al SLL. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el antígeno asociado a la enfermedad o trastorno es CD 19.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos incluyen la administración de las células o una composición que contiene las células a un sujeto, tejido o célula, tal como uno que tiene, está en riesgo o se sospecha que tiene la enfermedad, afección o trastorno. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el sujeto es el sujeto es un adulto. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el sujeto tiene más de 50, 60 o 70 años de edad o aproximadamente.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el sujeto ha sido tratado anteriormente con una terapia o un agente terapéutico dirigido a la enfermedad o afección, por ejemplo, CLL o SLL, antes de la administración de las células que expresan el receptor recombinante. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el sujeto ha sido tratado anteriormente con un trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT), por ejemplo, un HSCT alógeno o un HSCT autólogo. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el sujeto ha tenido un mal pronóstico después del tratamiento con una terapia convencional y/o ha fracasado con una o más líneas de terapia anterior, por ejemplo, al menos exactamente o aproximadamente 1, 2, 3, 4 o más líneas de terapia anterior. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el sujeto ha sido tratado con o ha recibido anteriormente al menos o aproximadamente al menos o aproximadamente 1, 2, 3 o 4 otras terapias para tratar la CLL distintas de una terapia de agotamiento linfocítico y/o la dosis de células que expresan el receptor de antígeno. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el sujeto ha sido tratado anteriormente con quimioterapia o radioterapia. En algunas divulgaciones, el sujeto es refractario o no responde a la otra terapia o agente terapéutico. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el sujeto tiene una enfermedad persistente o recidivante, por ejemplo, después del tratamiento con otra terapia o intervención terapéutica, incluyendo quimioterapia o radiación. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los sujetos tienen una leucemia linfocítica crónica (CLL) recidivante o refractaria (R/R) y han fracasado con o no son elegibles para una terapia con un inhibidor de la tirosina cinasa de Bruton (BTKi).

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el sujeto ha sido tratado anteriormente con una terapia o un agente terapéutico dirigido a la enfermedad o afección, por ejemplo, la CLL, antes de la administración de las células que expresan el receptor de antígeno recombinante. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente terapéutico es un inhibidor de cinasas, tal como un inhibidor de la tirosina cinasa de Bruton (Btk), por ejemplo, ibrutinib. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente terapéutico es un inhibidor 2 del linfoma de linfocitos B (Bcl-2), por ejemplo, venetoclax. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente terapéutico es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) que se une específicamente a un antígeno expresado por las células de la CLL o el NHL, por ejemplo, un antígeno de uno o más de CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Igkappa, Iglambda, CD79a, CD79b o CD30. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente terapéutico es un anticuerpo anti-CD20, por ejemplo,

rituximab. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente terapéutico es una quimioterapia de agotamiento que es una terapia de combinación que incluye rituximab, por ejemplo, una terapia de combinación de fludarabina y rituximab o una terapia de combinación de antraciclina y rituximab. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el sujeto ha sido tratado anteriormente con trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT), por ejemplo, HSCT alógeno o HSCT autólogo. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el sujeto ha sido tratado con o ha recibido anteriormente al menos o aproximadamente al menos o aproximadamente 1, 2, 3 o 4 otras terapias para tratar la CLL distintas de la terapia de agotamiento linfocito y/o la dosis de células que expresan el receptor de antígeno. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el sujeto ha sido tratado anteriormente con quimioterapia o radioterapia.

En algunas divulgaciones, el sujeto es refractario o no responde a la otra terapia o agente terapéutico. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el sujeto tiene una enfermedad persistente o recidivante, por ejemplo, después del tratamiento con otra terapia o intervención terapéutica, incluyendo quimioterapia o radiación.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el sujeto es uno que es elegible para un trasplante, tal como elegible para un trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT), por ejemplo, un HSCT alógeno. En algunos de dichos casos que se divulgan en el presente documento, el sujeto no ha recibido anteriormente un trasplante, a pesar de ser elegible, antes de la administración de las células modificadas por ingeniería genética (por ejemplo, linfocitos T-CAR) o una composición que contiene las células al sujeto como se divulga en el presente documento.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el sujeto es uno que no es elegible para un trasplante, tal como no elegible para un trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT), por ejemplo, un HSCT alógeno. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, a un sujeto de este tipo se le administran las células modificadas por ingeniería genética (por ejemplo, linfocitos T-CAR) o una composición que contiene las células de acuerdo con los casos que se divulgan en el presente documento.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos incluyen la administración de células a un sujeto seleccionado o identificado como que tiene CLL de riesgo alto. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el sujeto presenta una o más anomalías citogenéticas, tales como las asociadas a la CLL de riesgo alto. En algunas divulgaciones, la población que ha de tratarse incluye sujetos que tienen un Estado de Desempeño del Grupo de Oncología Cooperativo del Este (ECOG) que está en cualquier lugar entre 0-1.

En algunos de los casos que se divulgan en el presente documento, los sujetos que se han de tratar han fracasado en dos o más terapias anteriores. En algunos de los casos que se divulgan en el presente documento, el sujeto que se ha de tratar ha fracasado en tres o más terapias anteriores. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las terapias anteriores incluyen cualquiera de una terapia con un inhibidor de la tirosina cinasa de Bruton (BTK), tal como ibrutinib; venetoclax; una terapia de combinación que comprende fludarabina y rituximab; radioterapia; y trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT, por sus siglas en inglés). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el sujeto o paciente ha recibido anteriormente pero ha recaído después de la remisión, es refractario a, ha fracasado en y/o es intolerante al tratamiento con ibrutinib y/o venetoclax. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el sujeto o paciente ha recibido anteriormente pero ha recaído después de la remisión, es refractario a, ha fracasado en y/o es intolerante al tratamiento con ibrutinib y venetoclax.

En algunos casos, se divulgan en el presente documento métodos de tratamiento de sujetos seleccionados o identificados que han recaído después de la remisión o que son refractarios al tratamiento anterior con ibrutinib y venetoclax para tratar la CLL o el SLL. En algunas divulgaciones, a los sujetos seleccionados o identificados se les administra una terapia de linfocitos T-CAR, por ejemplo, terapia de linfocitos T-CAR anti-CD19, de acuerdo con los métodos que se divulgan.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el sujeto nunca ha conseguido una respuesta completa (CR), nunca recibió un trasplante de células madre autólogo (ASCT), es refractario a 1 o más tratamientos de segunda línea, tiene una enfermedad refractaria primaria y/o tiene una puntuación de desempeño del ECOG que está entre 0 y 1.

En algunas divulgaciones, los sujetos que se han de tratar de acuerdo con los casos que se divulgan en el presente documento incluyen sujetos con un diagnóstico de CLL o SLL. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los sujetos con CLL incluyen aquellos con diagnóstico de CLL con indicación de tratamiento basado en las directrices del Taller Internacional sobre Leucemia Linfocítica Crónica (iwCLL, por sus siglas en inglés) y la enfermedad medible clínicamente (afectación de la médula ósea por $> 30\%$ de linfocitos, linfocitosis de sangre periférica $> 5 \times 10^9/l$, y/o ganglios linfáticos medibles y/o hepática o esplenomegalia. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los sujetos con SLL incluyen aquellos con diagnóstico de SLL basado en linfadenopatía y/o esplenomegalia y $< 5 \times 10^9$ linfocitos B clonales CD19+ CD5+/ l [$< 5000/\mu l$] en la sangre periférica en el momento del diagnóstico con enfermedad medible definida como al menos una lesión $> 1,5$ cm en el diámetro transversal mayor, y que es SLL comprobado por biopsia.

En algunas divulgaciones, los sujetos no son elegibles para el tratamiento con inhibidor de la tirosina cinasa de Bruton (BTKi, por ejemplo, ibrutinib) debido a un requisito de anticoagulación de dosis completa o antecedentes de arritmia, o había fracasado en el tratamiento después de haber recibido anteriormente BTKi según se determina por enfermedad estable (SD, por sus siglas en inglés) o enfermedad progresiva (PD, por sus siglas en inglés) como mejor respuesta, PD después de una respuesta anterior o interrupción debido a intolerancia (por ejemplo, toxicidad inmanejable). En algunas divulgaciones, los sujetos se tratan de acuerdo con los casos que se divulgan en el presente documento si tenían una enfermedad de riesgo alto (según se determina por anomalías citogenéticas complejas (por ejemplo, cariotipo complejo), del(17p), mutación TP53, IGVH sin mutación) y habían fracasado con más de o igual a (por ejemplo, al menos) 2 terapias anteriores; o si tenían enfermedad de riesgo normal y habían fracasado con más de o igual a (por ejemplo, al menos) 3 terapias anteriores. En algunas divulgaciones, los sujetos que se han de tratar de acuerdo con los casos que se divulgan en el presente documento excluyen sujetos con enfermedad del SNC activa sin tratar, ECOG >1 o transformación de Richter.

En algunas divulgaciones, se divulgan composiciones, métodos y usos para la administración de una composición definida de la terapia celular, a dosis particulares, que se asocian a una tasa de respuesta alta y/o a una durabilidad alta de respuesta, y niveles y/o incidencia bajos de toxicidad. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la composición o dosis administrada es una dosis plana y/o fija, tal como una dosis plana precisa, de células y/o de una o más células que tienen un fenotipo particular, tal como un número particular de dichas células o un número que está dentro de un intervalo particular y/o grado de variabilidad o varianza en comparación con un número objetivo. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la composición o dosis administrada contiene una relación definida de células CD4⁺ y CD8⁺ (por ejemplo, relación 1:1 de linfocitos T CAR⁺ CD4⁺:CD8⁺) y/o contiene una relación que está dentro de un determinado grado de variabilidad con respecto a dicha relación, tal como no más del $\pm 10\%$, tal como no más del $\pm 8\%$, tal como un grado de variabilidad o varianza de no más del $\pm 10\%$, tal como no más del $\pm 8\%$. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células CD4⁺ y CD8⁺ se formulan y administran individualmente. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células administradas presentan una actividad y/o función uniforme, por ejemplo, la producción de citocinas, la apoptosis y/o la expansión. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las composiciones que se divulgan presentan una actividad altamente uniforme y definida, y una variabilidad baja entre células, por ejemplo, en términos del número de células, la función celular y/o la actividad celular, en la composición o entre preparaciones. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la uniformidad en la actividad y/o la función, por ejemplo, la variabilidad baja entre preparaciones de composiciones, permite una eficacia y/o una seguridad mejoradas. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la administración de las composiciones definidas dio como resultado una variabilidad baja del producto y una toxicidad baja, por ejemplo, CRS o neurotoxicidad, en comparación con la administración de composiciones celulares con alta heterogeneidad. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la composición uniforme y definida también presenta una expansión celular uniforme. Dicha uniformidad puede facilitar la identificación de la dosis, la ventana terapéutica, la evaluación de la respuesta a la dosis y la identificación de factores del sujeto que pueden correlacionarse con resultados de seguridad o toxicidad.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, en una determinada cohorte de sujetos que reciben una única infusión de un nivel de dosis particular, los sujetos en algunas cohortes pueden conseguir una tasa de respuesta global (ORR, en algunos casos también conocida como tasa de respuesta objetiva) de más del 80 %, una tasa de respuesta completa (CR) de más del 50 % a los 3 meses. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los sujetos que reciben una dosis definida muestran resultados de seguridad mejorados. En algunas divulgaciones, la tasa de CRS grave o NT grave es baja. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, pueden usarse factores particulares del sujeto, por ejemplo, determinados biomarcadores (por ejemplo, TNF-alfa o IL-16) para predecir el riesgo de toxicidad. En algunas divulgaciones, los casos que se divulgan en el presente documento pueden usarse para conseguir una tasa de respuesta alta con riesgo bajo de toxicidad.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, no más del 25 %, no más del 20 %, no más del 15 %, no más del 10 % o no más del 5 % de los sujetos tratados usando las composiciones, artículos de fabricación, kits, métodos y usos que se divulgan, reciben un agente (por ejemplo, tocilizumab y/o dexametasona) para mejorar, tratar o prevenir una toxicidad, ya sea antes o después de la administración de la terapia celular. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, al sujeto no se le administra ningún tratamiento de profilaxis antes de recibir las células modificadas por ingeniería genética (por ejemplo, linfocitos T-CAR).

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las divulgaciones proporcionan una ventaja, por ejemplo, permiten la administración de la terapia celular de forma ambulatoria. En algunas divulgaciones, la administración de la terapia celular, por ejemplo, dosis de linfocitos T de acuerdo con los casos que se divulgan en el presente documento, puede realizarse de forma ambulatoria o no requiere la admisión del sujeto en el hospital, tal como la admisión en el hospital que requiere una estancia de una noche. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, dicha administración ambulatoria puede permitir un acceso mayor y costes menores, manteniendo al mismo tiempo una tasa de respuesta alta y duradera con toxicidad baja. En algunas divulgaciones, el tratamiento ambulatorio puede ser ventajoso para pacientes que ya están inmunocomprometidos por tratamientos anteriores, por ejemplo, después del agotamiento linfocitario, y tienen un mayor riesgo de exposición en una estancia hospitalaria o en un entorno hospitalario. En algunas divulgaciones, el tratamiento ambulatorio también aumenta las opciones de tratamiento para sujetos que pueden no tener acceso a centros hospitalarios o de trasplante, ampliando de este modo

el acceso al tratamiento.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos y usos proporcionan o consiguen una tasa de respuesta más alta y/o respuestas o una eficacia más duraderas y/o un riesgo reducido de toxicidad u otros efectos secundarios que pueden asociarse a la terapia celular, tales como neurotoxicidad (NT) o síndrome de liberación de citocinas (CRS). En algunas divulgaciones, las observaciones que se divulgan indicaron una tasa baja de NT grave (sNT, por sus siglas en inglés) o CRS grave (sCRS, por sus siglas en inglés), y una tasa alta de pacientes sin ninguna toxicidad, por ejemplo, NT o CRS.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 % o al menos el 75 % o más de los sujetos tratados de acuerdo con los métodos que se divulgan, y/o con los artículos de fabricación o composiciones que se divulgan, consiguen una respuesta completa (CR). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, al menos el 75 %, al menos el 80 % o al menos el 90 % de los sujetos tratados de acuerdo con los métodos que se divulgan, y/o con los artículos de fabricación o composiciones que se divulgan, consiguen una respuesta objetiva (OR, por sus siglas en inglés). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, al menos el 35 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 % o más de los sujetos tratados de acuerdo con los métodos que se divulgan, y/o con los artículos de fabricación o composiciones que se divulgan, consiguen una CR o una OR en un mes, en dos meses o en tres meses. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 % o al menos el 75 % o más de los sujetos que habían fracasado en el tratamiento anterior con un inhibidor de la tirosina cinasa de Bruton (BTKi) y venetoclax tratados de acuerdo con los métodos que se divulgan, y/o con los artículos de fabricación o composiciones que se divulgan, consiguen una respuesta completa (CR). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, al menos el 75 %, al menos el 80 % o al menos el 90 % de los sujetos que habían fracasado en el tratamiento anterior con un BTKi y venetoclax tratados de acuerdo con los métodos que se divulgan, y/o con los artículos de fabricación o composiciones que se divulgan, consiguen una respuesta objetiva (OR). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, al menos el 35 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 % o más de los sujetos que habían fracasado en el tratamiento anterior con un BTKi y venetoclax tratados de acuerdo con los métodos que se divulgan, y/o con los artículos de fabricación o composiciones que se divulgan, consiguen una CR o una OR en un mes, en dos meses o en tres meses. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, en los sujetos tratados de acuerdo con el método, más del 50 %, más del 60 % o más del 70 % tenían una enfermedad residual mínima (MRD, por sus siglas en inglés) indetectable durante al menos un mes, al menos dos meses, al menos tres meses o al menos 6 meses después de administrar la dosis de células. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, en los sujetos que habían fracasado en el tratamiento anterior con un BTKi y venetoclax tratados de acuerdo con los métodos y/o con los artículos de fabricación o composiciones que se divulgan, más del 50 %, más del 60 % o más del 70 % tenían una enfermedad residual mínima (MRD, por sus siglas en inglés) indetectable durante al menos un mes, al menos dos meses, al menos tres meses o al menos 6 meses después de administrar la dosis de células.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, tres meses después del inicio de la administración de la terapia celular, 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 % o más de los sujetos tratados de acuerdo con los métodos que se divulgan, y/o con los artículos de fabricación o composiciones que se divulgan, permanecen en respuesta, tal como permanecer en CR u OR y/o tener una MRD indetectable. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, dicha respuesta, tal como CR u OR, es duradera durante al menos tres meses. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, tres meses después del inicio de la administración de la terapia celular, 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 % o más de los sujetos que habían fracasado en el tratamiento anterior con un BTKi y venetoclax tratados de acuerdo con los métodos que se divulgan, y/o con los artículos de fabricación o composiciones que se divulgan, permanecen en respuesta, tal como permanecer en CR u OR y/o tener una MRD indetectable. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, dicha respuesta, tal como CR u OR, es duradera durante al menos tres meses.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la respuesta resultante observada en dichos sujetos mediante el tratamiento de acuerdo con los métodos que se divulgan, y/o con los artículos de fabricación o composiciones que se divulgan, se asocia a o da como resultado un riesgo bajo de cualquier toxicidad o un riesgo bajo de toxicidad grave en la mayoría de los sujetos tratados. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, más de o más de aproximadamente el 30%, 35 %, 40 %, 50 %, 55 %, 60 % o más de los sujetos tratados de acuerdo con los métodos que se divulgan y/o con los artículos de fabricación o composiciones que se divulgan no presentan ningún grado de CRS o ningún grado de neurotoxicidad (NT). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, más de o más de aproximadamente el 50%, 60 %, 70 %, 80 % o más de los sujetos tratados de acuerdo con los métodos que se divulgan y/o con los artículos de fabricación o composiciones que se divulgan no presentan CRS grave o CRS de grado 3 o superior. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, más de o más de aproximadamente el 50%, 60 %, 70 %, 80 % o más de los sujetos tratados de acuerdo con los métodos que se divulgan, y/o con los artículos de fabricación o composiciones que se divulgan, no presentan neurotoxicidad grave o neurotoxicidad de grado 3 o superior, tal como neurotoxicidad de grado 4 o 5.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la respuesta resultante observada en dichos sujetos que habían fracasado en el tratamiento anterior con un BTKi y venetoclax mediante el tratamiento de acuerdo con los métodos que se divulgan, y/o con los artículos de fabricación o composiciones que se divulgan, se asocia a o da como resultado un riesgo bajo de cualquier toxicidad o un riesgo bajo de toxicidad grave en la mayoría de los sujetos tratados.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, más de o más de aproximadamente el 30%, 35 %, 40 %, 50 %, 55 %, 60 % o más de los sujetos que habían fracasado en el tratamiento anterior con un BTKi y venetoclax tratados de acuerdo con los métodos que se divulgan y/o con los artículos de fabricación o composiciones que se divulgan no presentan ningún grado de CRS o ningún grado de neurotoxicidad (NT). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, más de o más de aproximadamente el 50%, 60 %, 70 %, 80 % o más de los sujetos que habían fracasado en el tratamiento anterior con un BTKi y venetoclax tratados de acuerdo con los métodos que se divulgan no presentan CRS grave o CRS de grado 3 o superior. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, más de o más de aproximadamente el 50%, 60 %, 70 %, 80 % o más de los sujetos que habían fracasado en el tratamiento anterior con un BTKi y venetoclax tratados de acuerdo con los métodos que se divulgan, y/o con los artículos de fabricación o composiciones que se divulgan, no presentan neurotoxicidad grave o neurotoxicidad de grado 3 o superior, tal como neurotoxicidad de grado 4 o 5.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, al menos exactamente o aproximadamente el 45 %, 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de los sujetos tratados de acuerdo con el método y/o con los artículos de fabricación o composiciones que se divulgan no presentan CRS o neurotoxicidad de aparición precoz y/o no presentan una aparición de CRS antes de 1 día, 2 días, 3 días o 4 días después del inicio de la administración. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, al menos exactamente o aproximadamente el 45 %, 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de sujetos tratados de acuerdo con los métodos y/o con los artículos de fabricación o composiciones que se divulgan, no presentan una aparición de neurotoxicidad antes de 3 días, 4 días, 5 días, seis días o 7 días después del inicio de la administración. En algunas divulgaciones, la mediana de aparición de neurotoxicidad entre sujetos tratados de acuerdo con los métodos y/o con los artículos de fabricación o composiciones que se divulgan, está en o después de la mediana del pico de, o la mediana del tiempo hasta la resolución de, CRS en sujetos tratados de acuerdo con el método. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la mediana de aparición de neurotoxicidad entre sujetos tratados de acuerdo con el método es superior a exactamente o aproximadamente 8, 9, 10 u 11 días.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, al menos exactamente o aproximadamente el 45 %, 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de los sujetos que habían fracasado en el tratamiento anterior con un BTKi y venetoclax, tratados de acuerdo con el método y/o con los artículos de fabricación o composiciones que se divulgan que habían fracasado en el tratamiento anterior con un BTKi y venetoclax, no presentan CRS o neurotoxicidad de aparición precoz y/o no presentan una aparición de CRS antes de 1 día, 2 días, 3 días o 4 días después del inicio de la administración. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, al menos exactamente o aproximadamente el 45 %, 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de sujetos que habían fracasado en el tratamiento anterior con un BTKi y venetoclax tratados de acuerdo con los métodos, y/o con los artículos de fabricación o composiciones que se divulgan, no presentan una aparición de neurotoxicidad antes de 3 días, 4 días, 5 días, seis días o 7 días después del inicio de la administración. En algunas divulgaciones, la mediana de aparición de neurotoxicidad entre sujetos que habían fracasado en el tratamiento anterior con un BTKi y venetoclax tratados de acuerdo con los métodos, y/o con los artículos de fabricación o composiciones que se divulgan, está en o después de la mediana del pico de, o la mediana del tiempo hasta la resolución de, CRS en sujetos tratados de acuerdo con el método. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la mediana de aparición de neurotoxicidad entre sujetos que habían fracasado en el tratamiento anterior con un BTKi y venetoclax, tratados de acuerdo con el método es superior a exactamente o aproximadamente 8, 9, 10 u 11 días.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, dichos resultados se observan después de la administración de o de aproximadamente $2,5 \times 10^7$ a exactamente o aproximadamente $1,5 \times 10^8$, tal como de aproximadamente 5×10^7 a exactamente o aproximadamente 1×10^8 linfocitos T que expresan receptores recombinantes totales (por ejemplo, linfocitos T CAR+), tal como una dosis de linfocitos T que incluyen linfocitos T CD4+ y CD8+ administrados en una relación definida como se describe en el presente documento, por ejemplo, en exactamente o aproximadamente una relación 1:1, y/o en un número preciso o plano o fijo de linfocitos T CAR+, o un número preciso o plano o fijo de un tipo particular de linfocitos T CAR+ tales como linfocitos T CAR+ CD4+ y/o linfocitos T CAR+ CD8+, y/o un número de cualquiera de dichas células que está dentro de un grado de varianza especificado, tal como no más de, + o - (más o menos, en algunos casos indicado como $\pm$), el 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 % en comparación con dicho número preciso o plano o fijo. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, dicho número plano o fijo de células es de exactamente o aproximadamente $2,5 \times 10^7$ linfocitos T CAR+ totales o de linfocitos T CAR+ CD8+ y/o CD4+, 5×10^7 linfocitos T CAR+ totales o de linfocitos T CAR+ CD8+ y/o CD4+, o 1×10^8 linfocitos T CAR+ totales o de linfocitos T CAR+ CD8+ y/o CD4+. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el número de células en la dosis incluye o consiste en o consiste esencialmente en $2,5 \times 10^7$ linfocitos T CAR+ (opcionalmente $1,25 \times 10^7$ linfocitos T CAR+CD4+ y $1,25 \times 10^7$ linfocitos T CAR+CD8+); en algunos casos que se divulgan en el presente documento, incluye o consiste en o consiste esencialmente en 5×10^7 linfocitos T CAR+ (opcionalmente $2,5 \times 10^7$ linfocitos T CAR+CD4+ y $2,5 \times 10^7$ linfocitos T CAR+CD8+); en algunos casos que se divulgan en el presente documento, incluye 1×10^8 linfocitos T CAR+ (opcionalmente $0,5 \times 10^8$ linfocitos T CAR+CD4+ y $0,5 \times$

10⁸ linfocitos T CAR⁺CD8⁺). En algunas divulgaciones, el número de células administradas, está dentro de un determinado grado de varianza de dichos números en los casos mencionados anteriormente que se divulgan en el presente documento, tal como dentro de más o menos ($\pm$) el 5, 6, 7, 8, 9 o 10 %, tal como dentro de más o menos el 8 %, en comparación con dicho número o números de células. En algunas divulgaciones, la dosis está dentro de un intervalo en el que se observa una correlación (opcionalmente una relación lineal) entre el número de dichas células (por ejemplo, de linfocitos T CAR⁺ totales o de linfocitos T CAR⁺ CD8⁺ y/o CD4⁺) y uno o más resultados indicativos de respuesta terapéutica, o duración de la misma (por ejemplo, probabilidad de conseguir una remisión, una remisión completa y/o una duración particular de la remisión) y/o duración de cualquiera de los anteriores. En algunas divulgaciones, se encuentra que la dosis más alta de células administrada puede dar como resultado una mayor respuesta sin repercutir o afectar a, o sin repercutir o afectar sustancialmente a la incidencia o riesgo de toxicidad (por ejemplo, CRS o neurotoxicidad), o el grado de incidencia o riesgo de toxicidad, en el sujeto, por ejemplo, CRS grave o neurotoxicidad grave.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el sujeto que se ha de tratar de acuerdo con las divulgaciones tiene una función orgánica adecuada. Por ejemplo, en algunas divulgaciones, los sujetos presentan uno o más de los siguientes: creatinina sérica $\leq 1,5 \times$ límite superior ajustado por edad de la normalidad (ULN, por sus siglas en inglés) o aclaramiento de creatinina calculado (Cockcroft y Gault) > 30 ml/min; alanina aminotransferasa (ALT) $\leq 5 \times$ ULN y bilirrubina total $< 2,0$ mg/dl (o $< 3,0$ mg/dl para sujetos con síndrome de Gilbert o infiltración leucémica del hígado); función pulmonar adecuada, definida como disnea $\leq$ de Grado 1 de Criterios de Terminología Común para Acontecimientos Adversos (CTCAE, por sus siglas en inglés) y oxígeno saturado (SaO₂) ≥ 92 % en aire ambiente; y/o función cardíaca adecuada, definida como fracción de eyección del ventrículo izquierdo (LVEF, por sus siglas en inglés) ≥ 40 % evaluada por ecocardiograma (ECHO, por sus siglas en inglés) o exploración de adquisición dependiente de captación múltiple (MUGA, por sus siglas en inglés) realizada dentro de los 30 días anteriores a la evaluación de los sujetos para la administración de la composición de células modificadas por ingeniería genética.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos que se divulgan pueden conseguir una tasa de respuesta alta o particular (tal como una tasa de respuesta entre una población evaluada después de un determinado período posterior a la administración, tal como un mes o tres meses), por ejemplo, una ORR (tal como una ORR de 1 mes o 3 meses) de exactamente o aproximadamente el 75 % o más, el 80 % o más, el 85 % o más, y una tasa de CR (tal como una tasa de CR de 1 mes o 3 meses) de exactamente o aproximadamente el 30 % o más, el 35 % o más, el 40 % o más, el 45 % o más, el 50 % o más, el 55 % o más, el 60 % o más, el 65 % o más, el 70 % o más, el 71 % o más, el 72 % o más, el 73 % o más, el 74 % o más o aproximadamente el 75 % o más. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, dichas tasas de respuesta y durabilidad se reciben después de sólo una única administración o dosis de dicha terapia. El tratamiento de dichos sujetos mediante los métodos que se divulgan, y/o con los artículos de fabricación o composiciones que se divulgan, en algunos casos que se divulgan en el presente documento, también da como resultado que los sujetos consiguen la tasa alta de respuesta, pero sin presentar una incidencia mayor de toxicidades en desarrollo, tales como neurotoxicidad o CRS, incluso a una dosis celular más alta.

Por lo tanto, en algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos que se divulgan, artículos de fabricación y/o composiciones, pueden ofrecer ventajas sobre otros métodos o soluciones o enfoques disponibles para el tratamiento, tal como para la terapia celular adoptiva. En particular, entre los casos que se divulgan en el presente documento se encuentran aquellos que ofrecen una ventaja para los sujetos con CLL de riesgo alto, consiguiendo una respuesta duradera a una tasa alta, con una incidencia reducida de toxicidades o efectos secundarios.

A. Método de tratamiento

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 métodos de tratamiento que implican la administración de células modificadas por ingeniería genética o composiciones que contienen células modificadas por ingeniería genética, tales como linfocitos T modificados por ingeniería genética. También se divulgan métodos y usos de células modificadas por ingeniería genética (por ejemplo, linfocitos T) y/o composiciones de las mismas, incluyendo métodos para el tratamiento de sujetos que tienen una enfermedad o afección tal como una leucemia o un linfoma, por ejemplo, una leucemia linfocítica crónica (CLL) o un linfoma linfocítico de células pequeñas (SLL), que implican la administración de las células modificadas por ingeniería genética y/o composiciones de las mismas. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos y usos que se divulgan pueden conseguir una respuesta mejorada y/o respuestas o una eficacia más duraderas y/o un riesgo reducido de toxicidad u otros efectos secundarios, por ejemplo, en grupos particulares de sujetos tratados, en comparación con determinados métodos alternativos. En algunas divulgaciones, también se divulgan métodos de administración de células modificadas por ingeniería genética o composiciones que contienen células modificadas por ingeniería genética, tales como linfocitos T modificados por ingeniería genética, a un sujeto, tal como un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno. En algunas divulgaciones, también se divulgan usos de células modificadas por ingeniería genética o composiciones que contienen células modificadas por ingeniería genética, tales como linfocitos T modificados por ingeniería genética para el tratamiento de una enfermedad o trastorno. En algunas divulgaciones, también se divulgan usos de células modificadas por ingeniería

genética o composiciones que contienen células modificadas por ingeniería genética, tales como linfocitos T modificados por ingeniería genética para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno. En algunas divulgaciones, también se divulgan métodos de administración de células modificadas por ingeniería genética o composiciones que contienen células modificadas por ingeniería genética, tales como linfocitos T modificados por ingeniería genética, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno, o para la administración a un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno. En algunas divulgaciones, los usos de las células modificadas por ingeniería genética o composiciones que contienen células modificadas por ingeniería genética, tales como linfocitos T modificados por ingeniería genética están de acuerdo con cualquiera de los métodos que se describen en el presente documento.

Las células modificadas por ingeniería genética que expresan un receptor recombinante, tales como un receptor de antígeno quimérico (CAR), o composiciones que comprenden el mismo, que se describen en el presente documento son útiles en una diversidad de indicaciones terapéuticas, diagnósticas y profilácticas. Por ejemplo, las células modificadas por ingeniería genética o composiciones que comprenden las células modificadas por ingeniería genética son útiles en el tratamiento de una diversidad de enfermedades y trastornos en un sujeto. Dichos métodos y usos incluyen métodos y usos terapéuticos, por ejemplo, que implican la administración de las células modificadas por ingeniería genética, o composiciones que contienen las mismas, a un sujeto que tiene una enfermedad, afección o trastorno, tal como un tumor o cáncer. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células modificadas por ingeniería genética o composiciones que comprenden las mismas se administran en una cantidad eficaz para efectuar el tratamiento de la enfermedad o trastorno. Los usos incluyen usos de las células modificadas por ingeniería genética o composiciones en dichos métodos y tratamientos, y en la preparación de un medicamento con el fin de realizar dichos métodos terapéuticos. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células modificadas por ingeniería genética o composiciones que comprenden las células modificadas por ingeniería genética son para su uso en el tratamiento de una diversidad de enfermedades y trastornos en un sujeto, por ejemplo, de acuerdo con los métodos terapéuticos. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos se realizan administrando las células modificadas por ingeniería genética, o composiciones que comprenden las mismas, al sujeto que tiene o se sospecha que tiene la enfermedad o afección. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos tratan de este modo la enfermedad o afección o trastorno en el sujeto.

Se conocen métodos generales para la administración de células para terapia celular adoptiva y pueden usarse en relación con los métodos y composiciones que se divulgan. Por ejemplo, se describen métodos de terapia adoptiva de linfocitos T, por ejemplo, en la Publicación de solicitud de patente de los EE.UU. N.º 2003/0170238 de Gruenberg *et al.*; la Patente de los EE.UU. N.º 4.690.915 de Rosenberg; Rosenberg (2011) *Nat Rev Clin Oncol.* 8(10):577-85). Véase, por ejemplo, Themeli *et al.* (2013) *Nat Biotechnol.* 31(10): 928-933; Tsukahara *et al.* (2013) *Biochem Biophys Res Commun* 438(1): 84-9; Davila *et al.* (2013) *PLoS ONE* 8(4): e61338.

La enfermedad o afección que se trata puede ser cualquiera en la que la expresión de un antígeno esté asociada a y/o implicada en la etiología de una afección o trastorno patológico, por ejemplo, provoca, exacerba o está implicada de otra manera en dicha enfermedad, afección o trastorno. Los ejemplos de enfermedades y afecciones pueden incluir enfermedades o afecciones asociadas a neoplasia malignidad o transformación de células (por ejemplo, cáncer), enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria, o una enfermedad infecciosa, por ejemplo, provocada por un patógeno bacteriano, vírico u otro. Se han descrito anteriormente antígenos de ejemplo, que incluyen antígenos asociados a diversas enfermedades y afecciones que pueden tratarse. En casos particulares que se divulgan en el presente documento, el receptor de antígeno quimérico o TCR transgénico se une específicamente a un antígeno asociado a la enfermedad o afección.

Entre las enfermedades, afecciones y trastornos se encuentran tumores, incluyendo tumores sólidos, neoplasias malignas hemáticas y melanomas, e incluyendo tumores localizados y metastásicos, enfermedades infecciosas, tales como una infección con un virus u otro patógeno, por ejemplo, VIH, VHC, VHB, CMV, VPH y enfermedades parasitarias y enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la enfermedad, trastorno o afección es un tumor, cáncer, neoplasia maligna, neoplasia u otra enfermedad o trastorno proliferativo. Dichas enfermedades para el tratamiento de acuerdo con los métodos que se divulgan en el presente documento incluyen, pero sin limitación, leucemia, linfoma, por ejemplo, leucemia linfocítica crónica (CLL) y linfoma linfocítico de células pequeñas (SLL).

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el indicador de estado de desempeño del Grupo de Oncología Cooperativo del Este (ECOG) puede usarse para evaluar o seleccionar sujetos para el tratamiento, por ejemplo, sujetos que han tenido un desempeño deficiente de terapias anteriores (véase, por ejemplo, Oken *et al.* (1982) *Am J Clin Oncol.* 5:649-655). La Escala del ECOG del Estado de Desempeño describe el nivel de funcionamiento de un paciente en términos de su capacidad para cuidarse a sí mismo, su actividad diaria y su capacidad física (por ejemplo, caminar, trabajar, etc.). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, un estado de desempeño del ECOG de 0 indica que un sujeto puede realizar una actividad normal. En algunas divulgaciones, los sujetos con un estado de desempeño del ECOG de 1 presentan alguna restricción en la actividad física, pero el sujeto es totalmente ambulatorio. En algunas divulgaciones, los pacientes con un estado de desempeño del ECOG de 2 son más del 50 % ambulatorios. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el sujeto con un estado de desempeño del ECOG de 2 también puede tener capacidad de autocuidado; véase, por ejemplo,

Sørensen *et al.*, (1993) *Br J Cancer* 67(4) 773-775. Los criterios que reflejan el estado de desempeño del ECOG se describen en la **Tabla 1** a continuación:

Tabla 1. Criterios de estado de desempeño del ECOG	
Grado	Estado de desempeño del ECOG
0	Totalmente activo, capaz de realizar todo el desempeño previo a la enfermedad sin restricciones
1	Restringido en actividad físicamente extenuante, pero ambulatorio y capaz de realizar trabajos de naturaleza ligera o sedentaria, por ejemplo, trabajo doméstico ligero, trabajo de oficina
2	Ambulatorio y capaz de todo autocuidado, pero incapaz de realizar ninguna actividad laboral; levantado y aproximadamente más del 50 % de las horas de vigilia
3	Capaz de sólo autocuidado limitado; confinado a la cama o silla más del 50 % de las horas de vigilia
4	Totalmente incapacitado; no puede realizar ningún autocuidado; totalmente confinado a la cama o silla
5	Muerto

Los antígenos dirigidos por los receptores (por ejemplo, CAR) en algunos casos que se divulgan en el presente documento incluyen antígenos asociados a una neoplasia maligna de linfocitos B, tal como cualquiera de un número de marcadores de linfocitos B conocidos. En algunos casos que se divulgan 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 que se divulgan en el presente documento, el antígeno es CD19.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la terapia celular, por ejemplo, la terapia adoptiva de linfocitos T, se realiza mediante transferencia autóloga, en la que las células se aíslan y/o se preparan de otro modo a partir del sujeto que ha de recibir la terapia celular, o a partir de una muestra derivada de un sujeto de este tipo. Por lo tanto, en algunas divulgaciones, las células derivan de un sujeto, por ejemplo, paciente, que necesita un tratamiento y las células, después del aislamiento y el procesamiento se administran al mismo sujeto.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la terapia celular, por ejemplo, la terapia adoptiva de linfocitos T, se realiza por transferencia alogéna, en la que las células se aíslan y/o se preparan de otro modo a partir de un sujeto distinto de un sujeto que ha de recibir o que en última instancia recibe la terapia celular, por ejemplo, un primer sujeto. En dichos casos que se divulgan en el presente documento, las células después se administran a un sujeto diferente, por ejemplo, un segundo sujeto, de la misma especie. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los sujetos primero y segundo son genéticamente idénticos. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los sujetos primero y segundo son genéticamente similares. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el segundo sujeto expresa la misma clase o supertipo de HLA que el primer sujeto.

Las células pueden administrarse por cualquier medio adecuado, por ejemplo, mediante infusión en bolo, mediante inyección, por ejemplo, inyecciones intravenosas o subcutáneas, inyección intraocular, inyección periocular, inyección subretiniana, inyección intravítrea, inyección trans-septal, inyección subescleral, inyección intracoroidal, inyección intracameral, inyección subconjetal, inyección subconjuntival, inyección subtenoniana, inyección retrobulbar, inyección peribulbar o suministro juxtaescleral posterior. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, se administran por vía parenteral, por vía intrapulmonar e intranasal, y, si se desea para un tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, una dosis dada se administra mediante una única administración en bolo de las células. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, se administra mediante múltiples administraciones en bolo de las células, por ejemplo, durante un período de no más de 3 días, o mediante la administración por infusión continua de las células. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la administración de la dosis celular o cualquier terapia adicional, por ejemplo, la terapia de agotamiento linfóide, la terapia de intervención y/o la terapia de combinación, se realizan a través de un suministro ambulatorio.

Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosificación adecuada puede depender del tipo de enfermedad que ha de tratarse, del tipo de células o receptores recombinantes, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si las células se administran con fines preventivos o terapéuticos, la terapia anterior, los antecedentes clínicos del sujeto y la respuesta a las células, y el criterio del médico especialista. En algunos casos, las composiciones y células que se describen en el presente documento se administran al sujeto de una sola vez o durante una serie de tratamientos.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos comprenden la administración de un agente quimioterápico, por ejemplo, un agente quimioterápico de acondicionamiento.

El preacondicionamiento de sujetos con terapias de agotamiento inmunitario (por ejemplo, agotamiento linfóide) en algunas divulgaciones puede mejorar los efectos de la terapia celular adoptiva (ACT, por sus siglas en inglés).

Por lo tanto, en algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos incluyen administrar un agente de preconditionamiento, tal como un agente de agotamiento linfóide o quimioterápico, tal como ciclofosfamida, fludarabina o combinaciones de las mismas, a un sujeto antes del inicio de la terapia celular. Por ejemplo, al sujeto se le puede administrar un agente de preconditionamiento al menos 2 días antes, tal como al menos 3, 4, 5, 6 o 7 días antes, del inicio de la terapia celular. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, al sujeto se le administra un agente de preconditionamiento no más de 7 días antes, tal como no más de 6, 5, 4, 3 o 2 días antes, del inicio de la terapia celular.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el sujeto se preconditiona con ciclofosfamida a una dosis de entre o entre aproximadamente 20 mg/kg y 100 mg/kg, tal como entre o entre aproximadamente 40 mg/kg y 80 mg/kg. En algunas divulgaciones, el sujeto se preconditiona con o con aproximadamente 60 mg/kg de ciclofosfamida. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la ciclofosfamida puede administrarse en una dosis única o puede administrarse en una pluralidad de dosis, tal como se proporciona diariamente, cada dos días o cada tres días. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la ciclofosfamida se administra una vez al día durante uno o dos días. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, donde el agente de agotamiento linfóide comprende ciclofosfamida, al sujeto se le administra ciclofosfamida a una dosis de entre o entre aproximadamente 100 mg/m² y 500 mg/m², tal como entre o entre aproximadamente 200 mg/m² y 400 mg/m², o 250 mg/m² y 350 mg/m², inclusive. En algunos casos, al sujeto se le administran aproximadamente 300 mg/m² de ciclofosfamida. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la ciclofosfamida puede administrarse en una dosis única o puede administrarse en una pluralidad de dosis, tal como se proporciona diariamente, cada dos días o cada tres días. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la ciclofosfamida se administra diariamente, tal como durante 1-5 días, por ejemplo, durante 3 a 5 días. En algunos casos, al sujeto se le administran aproximadamente 300 mg/m² de ciclofosfamida, diariamente durante 3 días, antes del inicio de la terapia celular.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, donde el agente de agotamiento linfóide comprende fludarabina, al sujeto se le administra fludarabina a una dosis de entre o entre aproximadamente 1 mg/m² y 100 mg/m², tal como entre o entre aproximadamente 10 mg/m² y 75 mg/m², 15 mg/m² y 50 mg/m², 20 mg/m² y 40 mg/m², o 24 mg/m² y 35 mg/m², inclusive. En algunos casos, al sujeto se le administran aproximadamente 30 mg/m² de fludarabina. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la fludarabina puede administrarse en una dosis única o puede administrarse en una pluralidad de dosis, tal como se proporciona diariamente, cada dos días o cada tres días. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la fludarabina se administra diariamente, tal como durante 1-5 días, por ejemplo, durante 3 a 5 días. En algunos casos, al sujeto se le administran aproximadamente 30 mg/m² de fludarabina, diariamente durante 3 días, antes del inicio de la terapia celular.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente de agotamiento linfóide comprende una combinación de agentes, tal como una combinación de ciclofosfamida y fludarabina. Por lo tanto, la combinación de agentes puede incluir ciclofosfamida en cualquier dosis o esquema de administración, tales como los descritos anteriormente, y fludarabina a cualquier dosis o esquema de administración, tales como aquellos descritos anteriormente. Por ejemplo, en algunas divulgaciones, al sujeto se le administran 60 mg/kg (~2 g/m²) de ciclofosfamida y de 3 a 5 dosis de 25 mg/m² de fludarabina antes de la primera dosis o posterior.

Después de la administración de las células, se mide la actividad biológica de las poblaciones de células modificadas por ingeniería genética en algunos casos que se divulgan en el presente documento, por ejemplo, mediante cualquiera de un número de métodos conocidos. Los parámetros que han de evaluarse incluyen la unión específica de un linfocito T modificado o natural u otra célula inmunitaria al antígeno, *in vivo*, por ejemplo, mediante la formación de imágenes, o *ex vivo*, por ejemplo, mediante ELISA o citometría de flujo. En determinados casos que se divulgan en el presente documento, la capacidad de las células modificadas por ingeniería genética para destruir células diana puede medirse usando cualesquier métodos conocidos adecuados, tales como los ensayos de citotoxicidad que se describen en, por ejemplo, Kochenderfer *et al.*, *J. Immunotherapy*, 32(7): 689-702 (2009) y Herman *et al.* *J. Immunological Methods*, 285(1): 25-40 (2004). En determinados casos que se divulgan en el presente documento, la actividad biológica de las células se mide sometiendo a ensayo la expresión y/o secreción de una o más citocinas, tales como CD 107a, IFN γ , IL-2 y TNF.

En determinados casos que se divulgan en el presente documento, las células modificadas por ingeniería genética se modifican adicionalmente en cualquier número de maneras, de manera que aumente su eficacia terapéutica o profiláctica. Por ejemplo, el CAR o TCR modificado por ingeniería genética expresado por la población puede conjugarse directa o indirectamente a través de un enlazador con un resto de direccionamiento. La práctica de conjugar compuestos, por ejemplo, el CAR o TCR, con restos de direccionamiento es conocido. Véase, por ejemplo, Wadwa *et al.*, *J. Drug Targeting* 3: 111 (1995) y la Patente de los EE.UU. 5.087.616. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células se administran como parte de un tratamiento de combinación, tal como simultáneamente con o secuencialmente con, en cualquier orden, otra intervención terapéutica, tal como un anticuerpo o célula modificada por ingeniería genética o receptor o agente, tal como un agente citotóxico o terapéutico. Las células en algunos casos que se divulgan en el presente documento se coadministran con uno o más agentes terapéuticos adicionales o en relación con otra intervención terapéutica, ya sea simultáneamente o secuencialmente en cualquier orden. En algunos contextos, las células se coadministran con otra terapia suficientemente cercana en el tiempo de

manera que las poblaciones celulares potencian el efecto de uno o más agentes terapéuticos adicionales, o viceversa. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células se administran antes de los uno o más agentes terapéuticos. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células se administran después del uno o más agentes terapéuticos adicionales. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el uno o más agentes adicionales incluyen una citocina, tal como IL-2, por ejemplo, para potenciar la persistencia.

B. Dosificación

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, se administra una dosis de células a los sujetos de acuerdo con los métodos que se divulgan, y/o con los artículos de fabricación o composiciones que se divulgan. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el tamaño o el momento de las dosis se determina en función de la enfermedad o afección particular en el sujeto. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el tamaño o el momento de las dosis para una enfermedad particular en vista de la descripción que se divulga puede determinarse empíricamente.

En determinados casos que se divulgan en el presente documento, las células, o poblaciones individuales de subtipos de células, se administran al sujeto en un intervalo de aproximadamente un millón a aproximadamente 100 mil millones de células y/o esa cantidad de células por kilogramo de peso corporal, tal como, por ejemplo, de 1 millón a aproximadamente 50 mil millones de células (por ejemplo, aproximadamente 5 millones de células, aproximadamente 25 millones de células, aproximadamente 500 millones de células, aproximadamente mil millones de células, aproximadamente 5 mil millones de células, aproximadamente 20 mil millones de células, aproximadamente 30 mil millones de células, aproximadamente 40 mil millones de células o un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores anteriores), tal como de aproximadamente 10 millones a aproximadamente 100 mil millones de células (por ejemplo, aproximadamente 20 millones de células, aproximadamente 30 millones de células, aproximadamente 40 millones de células, aproximadamente 60 millones de células, aproximadamente 70 millones de células, aproximadamente 80 millones de células, aproximadamente 90 millones de células, aproximadamente 10 mil millones de células, aproximadamente 25 mil millones de células, aproximadamente 50 mil millones de células, aproximadamente 75 mil millones de células, aproximadamente 90 mil millones de células, o un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores anteriores), y en algunos casos que se divulgan en el presente documento de aproximadamente 100 millones de células a aproximadamente 50 mil millones de células (por ejemplo, aproximadamente 120 millones de células, aproximadamente 250 millones de células, aproximadamente 350 millones de células, aproximadamente 450 millones de células, aproximadamente 650 millones de células, aproximadamente 800 millones de células, aproximadamente 900 millones de células, aproximadamente 3 mil millones de células, aproximadamente 30 mil millones de células, aproximadamente 45 mil millones de células) o cualquier valor entre estos intervalos y/o por kilogramo de peso corporal. Las dosis pueden variar dependiendo de atributos particulares de la enfermedad o trastorno y/o paciente y/u otros tratamientos. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, dichos valores se refieren a números de células que expresan receptores recombinantes; en otros casos que se divulgan en el presente documento, se refieren al número de linfocitos T o PBMC o células totales administradas. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el número de células es el número de dichas células que son células viables.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosis de células es una dosis plana de células o una dosis fija de células de manera que la dosis de células no está vinculada o se basa en el área de superficie corporal o el peso de un sujeto.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosis de células modificadas genéticamente comprende de exactamente o aproximadamente 1×10^5 a exactamente o aproximadamente 5×10^8 linfocitos T que expresan CAR totales, de exactamente o aproximadamente 1×10^5 a exactamente o aproximadamente $2,5 \times 10^8$ linfocitos T que expresan CAR totales, de exactamente o aproximadamente 1×10^5 a exactamente o aproximadamente 1×10^8 linfocitos T que expresan CAR totales, de exactamente o aproximadamente 1×10^5 a exactamente o aproximadamente 5×10^7 linfocitos T que expresan CAR totales, de exactamente o aproximadamente 1×10^5 a exactamente o aproximadamente $2,5 \times 10^7$ linfocitos T que expresan CAR totales, de exactamente o aproximadamente 1×10^5 a exactamente o aproximadamente 1×10^7 linfocitos T que expresan CAR totales, de exactamente o aproximadamente 1×10^5 a exactamente o aproximadamente 5×10^6 linfocitos T que expresan CAR totales, de exactamente o aproximadamente 1×10^5 a exactamente o aproximadamente $2,5 \times 10^6$ linfocitos T que expresan CAR totales, de exactamente o aproximadamente 1×10^5 a exactamente o aproximadamente 1×10^6 linfocitos T que expresan CAR totales, de exactamente o aproximadamente 1×10^6 a exactamente o aproximadamente 5×10^8 linfocitos T que expresan CAR totales, de exactamente o aproximadamente 1×10^6 a exactamente o aproximadamente $2,5 \times 10^8$ linfocitos T que expresan CAR totales, de exactamente o aproximadamente 1×10^6 a exactamente o aproximadamente 1×10^8 linfocitos T que expresan CAR totales, de exactamente o aproximadamente 1×10^6 a exactamente o aproximadamente 5×10^7 linfocitos T que expresan CAR totales, de exactamente o aproximadamente 1×10^6 a exactamente o aproximadamente $2,5 \times 10^7$ linfocitos T que expresan CAR totales, de exactamente o aproximadamente 1×10^6 a exactamente o aproximadamente 1×10^7 linfocitos T que expresan CAR totales, de exactamente o aproximadamente 1×10^6 a exactamente o aproximadamente 5×10^6 linfocitos T que expresan CAR totales, de exactamente o aproximadamente 1×10^6 a exactamente o aproximadamente $2,5 \times 10^6$ linfocitos T que expresan CAR totales, de exactamente o aproximadamente $2,5 \times 10^6$ a exactamente o aproximadamente 5×10^8

[illegible]

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosis de células modificadas genéticamente comprende de exactamente o aproximadamente $2,5 \times 10^7$ a exactamente o aproximadamente $1,5 \times 10^8$ linfocitos T que expresan CAR totales, tal como de 5×10^7 a 1×10^8 linfocitos T que expresan CAR totales. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosis de células modificadas genéticamente comprende al menos o al menos aproximadamente $2,5 \times 10^7$ células que expresan CAR, al menos o al menos aproximadamente 5×10^7 células que expresan CAR, o al menos o al menos aproximadamente 1×10^8 células que expresan CAR. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosis de linfocitos T comprende: exactamente o aproximadamente $2,5 \times 10^7$ linfocitos T que expresan CAR. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosis de linfocitos T comprende exactamente o aproximadamente 1×10^8 linfocitos T que expresan CAR. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosis de linfocitos T comprende exactamente o aproximadamente 5×10^7 linfocitos T que expresan CAR. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el número de células es el número de dichas células que son células viables.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el número es con referencia al número total de CD3⁺, CD8⁺, o CD4⁺ y CD8⁺, en algunos casos que se divulgan en el presente documento también células que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR⁺). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el número de células es el número de dichas células que son células viables.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la terapia celular comprende la administración de una dosis que comprende un número de células de o de aproximadamente 1×10^5 a o a aproximadamente 5×10^8 linfocitos T totales CD3⁺, CD8⁺ o CD4⁺ y CD8⁺ o células que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR+) CD3⁺, CD8⁺ o CD4⁺ y CD8⁺, de o de aproximadamente 5×10^5 a o a aproximadamente 1×10^7 linfocitos T totales CD3⁺, CD8⁺ o CD4⁺ y CD8⁺ o células que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR+) CD3⁺, CD8⁺ o CD4⁺ y CD8⁺, o de o de aproximadamente 1×10^6 a o a aproximadamente 1×10^7 linfocitos T totales CD3⁺, CD8⁺ o CD4⁺ y CD8⁺ o células que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR+) CD3⁺, CD8⁺ o CD4⁺ y CD8⁺, cada uno inclusive. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la terapia celular comprende la administración de una dosis que comprende un número de células de o de aproximadamente 1×10^5 a o a aproximadamente 5×10^8 células CD3⁺/CAR⁺, CD8⁺/CAR⁺ o CD4⁺/CD8⁺/CAR⁺ totales, de o de aproximadamente 5×10^5 a o a aproximadamente 1×10^7 células CD3⁺/CAR⁺, CD8⁺/CAR⁺ o CD4⁺/CD8⁺/CAR⁺ totales, o de o de aproximadamente 1×10^6 a o a aproximadamente 1×10^7 células CD3⁺/CAR⁺, CD8⁺/CAR⁺ o CD4⁺/CD8⁺/CAR⁺ totales, cada uno inclusive. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el número de células es el número de dichas células que son células viables.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosis de células modificadas genéticamente comprende de o de aproximadamente $2,5 \times 10^7$ a $1,5 \times 10^8$ linfocitos T CD3+/CAR+, CD8+/CAR+ o CD4+/CD8+/CAR+ totales, tal como de 5×10^7 a 1×10^8 linfocitos T CD3+/CAR+, CD8+/CAR+ o CD4+/CD8+/CAR+ totales. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosis de células modificadas genéticamente comprende al menos o al menos aproximadamente $2,5 \times 10^7$ linfocitos T CD3+/CAR+, CD8+/CAR+ o CD4+/CD8+/CAR+, al menos o al menos aproximadamente 5×10^7 linfocitos T CD3+/CAR+, CD8+/CAR+ o CD4+/CD8+/CAR+, o al menos o al menos aproximadamente 1×10^8 linfocitos T CD3+/CAR+, CD8+/CAR+ o CD4+/CD8+/CAR+. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosis de células modificadas genéticamente comprende exactamente o aproximadamente linfocitos T $2,5 \times 10^7$ CD3+/CAR+, CD8+/CAR+ o CD4+/CD8+/CAR+, exactamente o aproximadamente 5×10^7 linfocitos T CD3+/CAR+, CD8+/CAR+ o CD4+/CD8+/CAR+, o exactamente o aproximadamente 1×10^8 linfocitos T CD3+/CAR+, CD8+/CAR+ o CD4+/CD8+/CAR+. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el número de células es el número de dichas células que son células viables.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosis de linfocitos T comprende: exactamente o aproximadamente 5×10^7 linfocitos T que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR) o exactamente o aproximadamente $2,5 \times 10^7$ linfocitos T CD8+ que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosis de linfocitos T comprende: exactamente o aproximadamente 1×10^8 linfocitos T que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR) o exactamente o aproximadamente 5×10^7 linfocitos T CD8+ que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosis de linfocitos T comprende: exactamente o aproximadamente $1,5 \times 10^8$ linfocitos T que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR) o exactamente o aproximadamente $0,75 \times 10^8$ linfocitos T CD8+ que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el número de células es el número de dichas células que son células viables.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los linfocitos T de la dosis incluyen linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ o linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, por ejemplo, cuando el sujeto es un ser humano, los linfocitos T CD8+ de la dosis, incluyendo en una dosis que incluye linfocitos T CD4+ y CD8+, incluye entre aproximadamente $2,5 \times 10^7$ y 1×10^8 células CD8+ que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR) totales, o una fracción de las mismas, tal como las presentes en una relación de células CD4+ a linfocitos T CD8+ 1:3 a 3:1, opcionalmente exactamente o aproximadamente 1:1.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, al paciente se le administran múltiples dosis, y cada una de las dosis o la dosis total puede estar dentro de cualquiera de los valores anteriores. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosis de células comprende la administración de o de aproximadamente 1×10^5 a o a aproximadamente 5×10^8 linfocitos T que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR) totales o linfocitos T totales, de o de aproximadamente 1×10^5 a o a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ linfocitos T que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR) totales o linfocitos T totales, de o de aproximadamente 1×10^5 a o a aproximadamente 1×10^8 linfocitos T que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR) totales o linfocitos T totales, de o de aproximadamente 5×10^5 a o a aproximadamente 1×10^7 linfocitos T que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR) totales o linfocitos T totales, o de o de aproximadamente 1×10^6 a o a aproximadamente 1×10^7 linfocitos T que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR) totales o linfocitos T totales, cada uno inclusive.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosis de células es una dosis plana de células o una dosis fija de células de manera que la dosis de células no está vinculada o se basa en el área de superficie corporal o el peso de un sujeto.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosis de células modificadas genéticamente comprende de o de aproximadamente 1×10^5 a 5×10^8 linfocitos T que expresan CAR totales, de 1×10^5 a $2,5 \times 10^8$ linfocitos T que expresan CAR totales, de 1×10^5 a 1×10^8 linfocitos T que expresan CAR totales, de 1×10^5 a 5×10^7 linfocitos T que expresan CAR totales, de 1×10^5 a $2,5 \times 10^7$ linfocitos T que expresan CAR totales, de 1×10^5 a 1×10^7 linfocitos T que expresan CAR totales, de 1×10^5 a 5×10^6 linfocitos T que expresan CAR totales, de 1×10^5 a $2,5 \times 10^6$ linfocitos T que expresan CAR totales, de 1×10^5 a 1×10^6 linfocitos T que expresan CAR totales, de 1×10^6 a 5×10^8 linfocitos T que expresan CAR totales, de 1×10^6 a $2,5 \times 10^8$ linfocitos T que expresan CAR totales, de 1×10^6 a 1×10^8 linfocitos T que expresan CAR totales, de 1×10^6 a 5×10^7 linfocitos T que expresan CAR totales, de 1×10^6 a $2,5 \times 10^7$ linfocitos T que expresan CAR totales, de 1×10^6 a 1×10^7 linfocitos T que expresan CAR totales, de 1×10^6 a 5×10^6 linfocitos T que expresan CAR totales, de 1×10^6 a $2,5 \times 10^6$ linfocitos T que expresan CAR totales, de $2,5 \times 10^6$ a 5×10^8 linfocitos T que expresan CAR totales, de $2,5 \times 10^6$ a $2,5 \times 10^8$ linfocitos T que expresan CAR totales, de $2,5 \times 10^6$ a 1×10^8 linfocitos T que expresan CAR totales, de $2,5 \times 10^6$ a 5×10^7 linfocitos T que expresan CAR totales, de $2,5 \times 10^6$ a $2,5 \times 10^7$ linfocitos T que expresan CAR totales, de $2,5 \times 10^6$ a 1×10^7 linfocitos T que expresan CAR totales, de $2,5 \times 10^6$ a 5×10^6 linfocitos T que expresan CAR totales, de 5×10^6 a 5×10^8 linfocitos T que expresan CAR totales, de 5×10^6 a $2,5 \times 10^8$ linfocitos T que expresan CAR totales, de 5×10^6 a 1×10^8 linfocitos T que expresan CAR totales, de 5×10^6 a 5×10^7 linfocitos T que expresan CAR totales, de 5×10^6 a 1×10^7 linfocitos T que expresan CAR totales, de 5×10^6 a $2,5 \times 10^7$ linfocitos T que expresan CAR totales, de 5×10^6 a 1×10^7 linfocitos T que expresan CAR totales, de 1×10^7 a 5×10^8 linfocitos T que expresan CAR totales, de 1×10^7 a $2,5 \times 10^8$ linfocitos T que expresan CAR totales, de

1 × 10⁷ a 1 × 10⁸ linfocitos T que expresan CAR totales, de 1 × 10⁷ a 5 × 10⁷ linfocitos T que expresan CAR totales, de 1 × 10⁷ a 2,5 × 10⁷ linfocitos T que expresan CAR totales, de 2,5 × 10⁷ a 5 × 10⁸ linfocitos T que expresan CAR totales, de 2,5 × 10⁷ a 2,5 × 10⁸ linfocitos T que expresan CAR totales, de 2,5 × 10⁷ a 1 × 10⁸ linfocitos T que expresan CAR totales, de 2,5 × 10⁷ a 5 × 10⁷ linfocitos T que expresan CAR totales, de 5 × 10⁷ a 5 × 10⁸ linfocitos T que expresan CAR totales, de 5 × 10⁷ a 2,5 × 10⁸ linfocitos T que expresan CAR totales, de 5 × 10⁷ a 1 × 10⁸ linfocitos T que expresan CAR totales, de 1 × 10⁸ a 5 × 10⁸ linfocitos T que expresan CAR totales, de 1 × 10⁸ a 2,5 × 10⁸ linfocitos T que expresan CAR totales, o de 2,5 × 10⁸ a 5 × 10⁸ linfocitos T que expresan CAR totales. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el número de células es el número de dichas células que son células viables.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosis de células modificadas genéticamente comprende de exactamente o aproximadamente 2,5 × 10⁷ a exactamente o aproximadamente 1,5 × 10⁸ linfocitos T que expresan CAR totales, tal como de 5 × 10⁷ a 1 × 10⁸ linfocitos T que expresan CAR totales. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosis de células modificadas genéticamente comprende al menos o al menos aproximadamente 2,5 × 10⁷ células que expresan CAR, al menos o al menos aproximadamente 5 × 10⁷ células que expresan CAR, o al menos o al menos aproximadamente 1 × 10⁸ células que expresan CAR. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosis de linfocitos T comprende: exactamente o aproximadamente 2,5 × 10⁷ linfocitos T que expresan CAR. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosis de linfocitos T comprende exactamente o aproximadamente 1 × 10⁸ linfocitos T que expresan CAR. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosis de linfocitos T comprende exactamente o aproximadamente 5 × 10⁷ linfocitos T que expresan CAR. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el número de células es el número de dichas células que son células viables.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el número es con referencia al número total de CD3⁺, CD8⁺, o CD4⁺ y CD8⁺, en algunos casos que se divulgan en el presente documento también células que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR⁺). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el número de células es el número de dichas células que son células viables.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la terapia celular comprende la administración de una dosis que comprende un número de células de o de aproximadamente 1 × 10⁵ a o a aproximadamente 5 × 10⁸ linfocitos T totales CD3⁺, CD8⁺ o CD4⁺ y CD8⁺ o células que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR⁺) CD3⁺, CD8⁺ o CD4⁺ y CD8⁺, de o de aproximadamente 5 × 10⁵ a o a aproximadamente 1 × 10⁷ linfocitos T totales CD3⁺, CD8⁺ o CD4⁺ y CD8⁺, o de o de aproximadamente 1 × 10⁶ a o a aproximadamente 1 × 10⁷ linfocitos T totales CD3⁺, CD8⁺ o CD4⁺ y CD8⁺ o células que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR⁺) CD3⁺, CD8⁺ o CD4⁺ y CD8⁺, cada uno inclusive. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la terapia celular comprende la administración de una dosis que comprende un número de células de o de aproximadamente 1 × 10⁵ a o a aproximadamente 5 × 10⁸ células CD3⁺/CAR⁺, CD8⁺/CAR⁺ o CD4⁺/CD8⁺/CAR⁺ totales, de o de aproximadamente 5 × 10⁵ a o a aproximadamente 1 × 10⁷ células CD3⁺/CAR⁺, CD8⁺/CAR⁺ o CD4⁺/CD8⁺/CAR⁺ totales, o de o de aproximadamente 1 × 10⁶ a o a aproximadamente 1 × 10⁷ células CD3⁺/CAR⁺, CD8⁺/CAR⁺ o CD4⁺/CD8⁺/CAR⁺ totales, cada uno inclusive. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el número de células es el número de dichas células que son células viables.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosis de células modificadas genéticamente comprende de o de aproximadamente 2,5 × 10⁷ a 1,5 × 10⁸ linfocitos T CD3⁺/CAR⁺, CD8⁺/CAR⁺ o CD4⁺/CD8⁺/CAR⁺ totales, tal como de 5 × 10⁷ a 1 × 10⁸ linfocitos T CD3⁺/CAR⁺, CD8⁺/CAR⁺ o CD4⁺/CD8⁺/CAR⁺ totales. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosis de células modificadas genéticamente comprende al menos o al menos aproximadamente 2,5 × 10⁷ linfocitos T CD3⁺/CAR⁺, CD8⁺/CAR⁺ o CD4⁺/CD8⁺/CAR⁺, al menos o al menos aproximadamente 5 × 10⁷ linfocitos T CD3⁺/CAR⁺, CD8⁺/CAR⁺ o CD4⁺/CD8⁺/CAR⁺, o al menos o al menos aproximadamente 1 × 10⁸ linfocitos T CD3⁺/CAR⁺, CD8⁺/CAR⁺ o CD4⁺/CD8⁺/CAR⁺. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosis de células modificadas genéticamente comprende exactamente o aproximadamente linfocitos T 2,5 × 10⁷ CD3⁺/CAR⁺, CD8⁺/CAR⁺ o CD4⁺/CD8⁺/CAR⁺, exactamente o aproximadamente 5 × 10⁷ linfocitos T CD3⁺/CAR⁺, CD8⁺/CAR⁺ o CD4⁺/CD8⁺/CAR⁺, o exactamente o aproximadamente 1 × 10⁸ linfocitos T CD3⁺/CAR⁺, CD8⁺/CAR⁺ o CD4⁺/CD8⁺/CAR⁺. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el número de células es el número de dichas células que son células viables.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosis de linfocitos T comprende: exactamente o aproximadamente 5 × 10⁷ linfocitos T que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR) o exactamente o aproximadamente 2,5 × 10⁷ linfocitos T CD8⁺ que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosis de linfocitos T comprende: exactamente o aproximadamente 1 × 10⁸ linfocitos T que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR) o exactamente o aproximadamente 5 × 10⁷ linfocitos T CD8⁺ que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosis de linfocitos T comprende: exactamente o aproximadamente 1,5 × 10⁸ linfocitos T que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR) o exactamente o aproximadamente 0,75 × 10⁸ linfocitos T CD8⁺ que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el número de células es el número de dichas células que son células viables.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, al paciente se le administran múltiples dosis, y cada una de las dosis o la dosis total puede estar dentro de cualquiera de los valores anteriores. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosis de células comprende la administración de o de aproximadamente 1×10^5 a o a aproximadamente 5×10^8 linfocitos T que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR) totales o linfocitos T totales, de o de aproximadamente 1×10^5 a o a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ linfocitos T que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR) totales o linfocitos T totales, de o de aproximadamente 1×10^5 a o a aproximadamente 1×10^8 linfocitos T que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR) totales o linfocitos T totales, de o de aproximadamente 5×10^5 a o a aproximadamente 1×10^7 linfocitos T que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR) totales o linfocitos T totales, o de o de aproximadamente 1×10^6 a o a aproximadamente 1×10^7 linfocitos T que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR) totales o linfocitos T totales, cada uno inclusive.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los linfocitos T de la dosis incluyen linfocitos T CD4⁺, linfocitos T CD8⁺ o linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T CD8⁺.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosis de células, por ejemplo, linfocitos T que expresan receptores recombinantes, se administra al sujeto como una dosis única o se administra sólo una vez dentro de un período de dos semanas, un mes, tres meses, seis meses, 1 año o más.

En el contexto de la terapia celular adoptiva, la administración de una "dosis" dada abarca la administración de la cantidad o número dado de células como una única composición y/o única administración ininterrumpida, por ejemplo, como una única inyección o infusión continua, y también abarca la administración de la cantidad o número dado de células como una dosis dividida o como una pluralidad de composiciones, que se divulga en múltiples composiciones o infusiones individuales, durante un período de tiempo especificado, tal como durante no más de 3 días. Por lo tanto, en algunos contextos, la dosis es una administración única o continua del número especificado de células, dada o iniciada en un único punto en el tiempo. En algunos contextos, sin embargo, la dosis se administra en múltiples inyecciones o infusiones durante un período de no más de tres días, tal como una vez al día durante tres días o durante dos días o mediante múltiples infusiones durante un período de un único día.

Por lo tanto, en algunas divulgaciones, las células de la dosis se administran en una única composición farmacéutica. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células de la dosis se administran en una pluralidad de composiciones, que contienen colectivamente las células de la dosis.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células de la dosis pueden administrarse mediante la administración de una pluralidad de composiciones o soluciones, tal como una primera y una segunda, opcionalmente más, conteniendo cada una algunas células de la dosis. En algunas divulgaciones, la pluralidad de composiciones, conteniendo, cada una, una población y/o subtipos diferentes de células, se administran por separado o independientemente, opcionalmente dentro de un período de tiempo determinado. Por ejemplo, las poblaciones o subtipos de células pueden incluir linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺, respectivamente, y/o poblaciones enriquecidas con CD8⁺ y CD4⁺, respectivamente, por ejemplo, linfocitos T CD4⁺ y/o CD8⁺ incluyendo cada uno individualmente células modificadas genéticamente para expresar el receptor recombinante. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la administración de la dosis comprende la administración de una primera composición que comprende una dosis de linfocitos T CD8⁺ o una dosis de linfocitos T CD4⁺ y la administración de una segunda composición que comprende la otra de la dosis de linfocitos T CD4⁺ y los linfocitos T CD8⁺.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la administración de la composición o dosis, por ejemplo, la administración de la pluralidad de composiciones celulares, implica la administración de las composiciones celulares por separado. En algunas divulgaciones, las administraciones separadas se realizan simultáneamente, o secuencialmente, en cualquier orden. En casos particulares que se divulgan en el presente documento, las administraciones separadas se realizan secuencialmente administrando, en cualquier orden, una primera composición que comprende una dosis de linfocitos T CD8⁺ o una dosis de linfocitos T CD4⁺ y una segunda composición que comprende la otra de la dosis de linfocitos T CD4⁺ y los linfocitos T CD8⁺. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosis comprende una primera composición y una segunda composición, y la primera composición y la segunda composición se administran dentro de 48 horas entre sí, tal como no más de 36 horas entre sí o no más de 24 horas entre sí. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la primera composición y la segunda composición se administran con de exactamente o aproximadamente 0 a exactamente o aproximadamente 12 horas de diferencia, de exactamente o aproximadamente 0 a exactamente o aproximadamente 6 horas de diferencia o de exactamente o aproximadamente 0 a exactamente o aproximadamente 2 horas de diferencia. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el inicio de la administración de la primera composición y el inicio de la administración de la segunda composición se realizan con no más de exactamente o aproximadamente 2 horas, no más de exactamente o aproximadamente 1 hora, o no más de exactamente o aproximadamente 30 minutos de diferencia, no más de exactamente o aproximadamente 15 minutos, no más de exactamente o aproximadamente 10 minutos o no más de exactamente o aproximadamente 5 minutos de diferencia. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el inicio y/o finalización de la administración de la primera composición y la finalización y/o el inicio de la administración de la segunda composición se realizan con no más de exactamente o aproximadamente 2 horas, no más de exactamente o aproximadamente 1 hora, o no más de

exactamente o aproximadamente 30 minutos de diferencia, no más de exactamente o aproximadamente 15 minutos, no más de exactamente o aproximadamente 10 minutos o no más de exactamente o aproximadamente 5 minutos de diferencia.

En algunas composiciones, la primera composición, por ejemplo, la primera composición de la dosis, comprende linfocitos T CD4⁺. En algunas composiciones, la primera composición, por ejemplo, la primera composición de la dosis, comprende linfocitos T CD8⁺. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la primera composición se administra antes de la segunda composición. En casos particulares que se divulgan en el presente documento, los linfocitos T CD8⁺ se administran antes que los linfocitos T CD4⁺.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosis o composición de células incluye una relación definida u objetivo de células CD4⁺ que expresan un receptor recombinante (por ejemplo, CAR) a células CD8⁺ que expresan un receptor recombinante (por ejemplo, CAR) y/o de células CD4⁺ a células CD8⁺, relación que es opcionalmente de aproximadamente 1:1 o es de entre aproximadamente 1:3 y aproximadamente 3:1, tal como aproximadamente 1:1. En algunas divulgaciones, la administración de una composición o dosis con la relación objetivo o deseada de diferentes poblaciones celulares (tal como relación CD4⁺:CD8⁺ o relación CAR⁺CD4⁺:CAR⁺CD8⁺, por ejemplo, 1:1) implica la administración de una composición celular que contiene una de las poblaciones y después la administración de una composición celular separada que comprende la otra de las poblaciones, donde la administración es exactamente o aproximadamente en la relación objetivo o deseada. En algunas divulgaciones, la administración de una dosis o composición de células en una relación definida conduce a una expansión, una persistencia y/o una actividad antitumoral mejoradas de la terapia de linfocitos T.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosis o composición de células incluye una relación definida u objetivo de células CD4⁺ que expresan un receptor recombinante a células CD8⁺ que expresan un receptor recombinante y/o de células CD4⁺ a células CD8⁺, relación que es opcionalmente de aproximadamente 1:1. En algunas divulgaciones, la administración de una composición o dosis con la relación objetivo o deseada de diferentes poblaciones celulares (tal como relación CD4⁺:CD8⁺ o relación CAR⁺CD4⁺:CAR⁺CD8⁺, por ejemplo, 1:1) implica la administración de una composición celular que contiene una de las poblaciones y después la administración de una composición celular separada que comprende la otra de las poblaciones, donde la administración es exactamente o aproximadamente en la relación objetivo o deseada. En algunas divulgaciones, la administración de una dosis o composición de células en una relación definida conduce a una expansión, una persistencia y/o una actividad antitumoral mejoradas de la terapia de linfocitos T.

En casos particulares que se divulgan en el presente documento, los números y/o concentraciones de células se refieren al número de células que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR) o el número de linfocitos T que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR) o T CD3⁺ o un subconjunto de linfocitos T CD4⁺ y/o CD8⁺ de los mismos. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el número y/o concentración de células se refiere a dicho número de células que son células viables.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosis de células modificadas genéticamente es o es de aproximadamente 5×10^7 células viables CD3⁺ CAR⁺, que incluye una dosis separada de exactamente o aproximadamente $2,5 \times 10^7$ células viables CD4⁺ CAR⁺ y exactamente o aproximadamente $2,5 \times 10^7$ células viables CD8⁺ CAR⁺. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosis de células modificadas genéticamente es o es de aproximadamente 1×10^8 células viables CD3⁺ CAR⁺, que incluye una dosis separada de exactamente o aproximadamente 5×10^7 células viables CD4⁺ CAR⁺ y exactamente o aproximadamente 5×10^7 células viables CD8⁺ CAR⁺. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosis de células modificadas genéticamente es o es de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ células viables CD3⁺ CAR⁺, que incluye una dosis separada de exactamente o aproximadamente $0,75 \times 10^8$ células viables CD4⁺ CAR⁺ y exactamente o aproximadamente $0,75 \times 10^8$ células viables CD8⁺ CAR⁺.

C. Respuesta, eficacia y supervivencia

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la administración trata eficazmente al sujeto a pesar de que el sujeto ha fracasado, se ha vuelto refractario y/o resistente a otra terapia. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la administración trata eficazmente al sujeto a pesar de que el sujeto se ha vuelto resistente a otra terapia. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, al menos el 30 % de los sujetos tratados de acuerdo con el método consiguen una remisión completa (CR); y/o al menos aproximadamente el 75 % de los sujetos tratados de acuerdo con el método consiguen una respuesta objetiva (OR). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, al menos o aproximadamente al menos el 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 % o más de los sujetos tratados de acuerdo con el método consiguen una CR y/o al menos o aproximadamente al menos el 50 %, 60 %, 70 % u 80 % consiguen una respuesta objetiva (OR). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, al menos el 30 % de los sujetos que han fracasado tanto en una terapia anterior con un inhibidor de BTK (por ejemplo, ibrutinib) como con venetoclax, tratados de acuerdo con el método consiguen una remisión completa (CR); y/o al menos aproximadamente el 75 % de los sujetos que han fracasado tanto en una terapia anterior con un inhibidor de BTK (por ejemplo, ibrutinib) como con venetoclax, tratados de acuerdo con el método consiguen una respuesta objetiva (OR). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, al menos o aproximadamente

al menos el 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 % o más de los sujetos que han fracasado tanto en una terapia anterior con un inhibidor de BTK (por ejemplo, ibrutinib) como con venetoclax, tratados de acuerdo con el método consiguen una CR y/o al menos o aproximadamente al menos el 50 %, 60 %, 70 % u 80 % consiguen una respuesta objetiva (OR). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los criterios evaluados para un tratamiento eficaz incluyen la tasa de respuesta global (ORR; también conocida en algunos casos como tasa de respuesta objetiva), la respuesta completa (CR; también conocida en algunos casos como respuesta completa), la remisión completa con recuperación incompleta del hemograma (CRi), la enfermedad estable (SD) y/o la enfermedad parcial (PD).

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la duración de la respuesta antes de la progresión es durante más de 1 mes, más de 2 meses, más de 3 meses, más de 6 meses o más. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, al menos el 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 % o más de los sujetos tratados de acuerdo con los métodos que se divulgan en el presente documento consiguen una remisión completa (CR; también conocida en algunos casos como respuesta completa) exactamente o aproximadamente 3 meses o exactamente o aproximadamente 6 meses después de la administración de la terapia celular.

En algunas divulgaciones, la administración de acuerdo con los métodos que se divulgan y/o con los artículos de fabricación o composiciones que se divulgan, generalmente reduce o previene la expansión o carga de enfermedad o afección en el sujeto. Por ejemplo, cuando la enfermedad o afección es un tumor, los métodos generalmente reducen el tamaño del tumor, el volumen, la metástasis, el porcentaje de blastos en la médula ósea o el cáncer detectable molecularmente y/o mejoran el pronóstico o la supervivencia u otro síntoma asociado a la carga tumoral.

La carga de enfermedad puede abarcar un número total de células de la enfermedad en el sujeto o en un órgano, tejido o fluido corporal del sujeto, tal como el órgano o tejido del tumor u otra ubicación, por ejemplo, lo que indicaría metástasis. Por ejemplo, las células tumorales pueden detectarse y/o cuantificarse en la sangre o la médula ósea en el contexto de determinadas neoplasias malignas hemáticas. La carga de enfermedad puede incluir, en algunos casos que se divulgan en el presente documento, la masa de un tumor, el número o extensión de metástasis y/o el porcentaje de células blásticas presentes en la médula ósea.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, un sujeto tiene leucemia. La extensión de la carga de enfermedad puede determinarse mediante la evaluación de la leucemia residual en la sangre o la médula ósea.

En algunas divulgaciones, las tasas de respuesta en sujetos, tales como sujetos con CLL, se basan en los criterios de respuesta del Taller Internacional sobre Leucemia Linfocítica Crónica (IWCLL) (Hallek, *et al.*, *Blood* 15 de junio de 2008; 111(12): 5446-5456). En algunas divulgaciones, las tasas de respuesta en sujetos, tales como sujetos con CLL, se basan en los criterios de respuesta del Taller Internacional sobre Leucemia Linfocítica Crónica (IWCLL) (Hallek *et al.*, *Blood* 2018 131 (25): 2745-2760). En algunas divulgaciones, estos criterios se describen de la siguiente manera: remisión completa (CR; también conocida en algunos casos como respuesta completa), que en algunas divulgaciones requiere la ausencia de linfocitos clonales de sangre periférica mediante inmunofenotipado, la ausencia de linfadenopatía, la ausencia de hepatomegalia o esplenomegalia, la ausencia de síntomas constitucionales y hemogramas satisfactorios; remisión completa con recuperación incompleta de la médula (CRi), que en algunas divulgaciones se describe como CR anterior, pero sin hemogramas normales; remisión parcial (PR; también conocida en algunos casos como respuesta parcial), que en algunas divulgaciones se describe como una caída ≥ 50 % en el recuento de linfocitos, una reducción ≥ 50 % en la linfadenopatía o una reducción ≥ 50 % en el hígado o bazo, junto con una mejora en los recuentos de sangre periférica; enfermedad progresiva (PD), que en algunas divulgaciones se describe como un aumento ≥ 50 % en el recuento de linfocitos a $> 5 \times 10^9/l$, un aumento ≥ 50 % en la linfadenopatía, un aumento ≥ 50 % en el tamaño del hígado o bazo, transformación de Richter o nuevas citopenias debidas a la CLL; y enfermedad estable, que en algunas divulgaciones se describe como que no cumple los criterios para CR, CRi, PR o PD.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los sujetos presentan una CR u OR si, dentro de 1 mes de la administración de la dosis de células, los ganglios linfáticos en el sujeto tienen menos de exactamente o aproximadamente 20 mm de tamaño, menos de exactamente o aproximadamente 10 mm de tamaño o menos de exactamente o aproximadamente 10 mm de tamaño.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, no se detecta un clon índice de la CLL en la médula ósea del sujeto (o en la médula ósea de más del 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más de los sujetos tratados de acuerdo con los métodos). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, un clon índice de la CLL se evalúa mediante secuenciación profunda de IgH. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el clon índice no se detecta en un momento que es exactamente o aproximadamente o al menos exactamente o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 18 o 24 meses después de la administración de las células.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, un sujeto presenta una enfermedad morfológica si hay más de o igual al 5 % de blastos en la médula ósea, por ejemplo, según se detecta mediante microscopía óptica, tal como más de o igual al 10 % de blastos en la médula ósea, más de o igual al 20 % de blastos en la médula ósea, más de o igual al 30 % de blastos en la médula ósea, más de o igual al 40 % de blastos en la médula ósea o más de o igual al 50 % de blastos en la médula ósea. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, un sujeto presenta

una remisión completa o clínica si hay menos del 5 % de blastos en la médula ósea.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, un sujeto tiene leucemia. La extensión de la carga de enfermedad puede determinarse mediante la evaluación de la leucemia residual en la sangre o la médula ósea.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, un sujeto presenta una enfermedad morfológica si hay más de o igual al 5 % de blastos en la médula ósea, por ejemplo, según se detecta mediante microscopía óptica, tal como más de o igual al 10 % de blastos en la médula ósea, más de o igual al 20% de blastos en la médula ósea, más de o igual al 30% de blastos en la médula ósea, más de o igual al 40 % de blastos en la médula ósea o más de o igual al 50 % de blastos en la médula ósea. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, un sujeto presenta una remisión completa o clínica si hay menos del 5 % de blastos en la médula ósea.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, un sujeto puede presentar una remisión completa, pero hay presente una pequeña proporción de células leucémicas residuales morfológicamente indetectables (mediante técnicas de microscopía óptica). Se dice que un sujeto presenta enfermedad residual mínima (MRD) si el sujeto presenta menos del 5 % de blastos en la médula ósea y presenta cáncer detectable molecularmente. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el cáncer detectable molecularmente puede evaluarse usando cualquiera de una diversidad de técnicas moleculares que permiten la detección sensible de un pequeño número de células. En algunas divulgaciones, dichas técnicas incluyen ensayos de PCR, que pueden determinar reordenamientos únicos del gen del receptor de linfocitos T/Ig o transcritos de fusión producidos por translocaciones cromosómicas. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, puede usarse citometría de flujo para identificar células cancerosas basándose en inmunofenotipos específicos de leucemia. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la detección molecular del cáncer puede detectar tan sólo 1 célula de leucemia en 100.000 células normales. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, un sujeto presenta MRD que es detectable molecularmente si se detecta al menos o más de 1 célula de leucemia en 100.000 células, tal como mediante PCR o citometría de flujo. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la carga de enfermedad de un sujeto es indetectable molecularmente o MRD⁻, de manera que, en algunos casos que se divulgan en el presente documento, no se pueden detectar células de leucemia en el sujeto usando PCR o técnicas de citometría de flujo.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, un clon índice de la leucemia, por ejemplo, la CLL, no se detecta en la médula ósea del sujeto (o en la médula ósea de más del 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más de los sujetos tratados de acuerdo con los métodos. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, un clon índice de la leucemia, por ejemplo, la CLL, se evalúa mediante secuenciación profunda de IGH. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el clon índice no se detecta en un momento que es exactamente o aproximadamente o al menos exactamente o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 18 o 24 meses después de la administración de las células.

En algunas divulgaciones, la MRD se detecta mediante citometría de flujo. La citometría de flujo puede usarse para controlar muestras de médula ósea y sangre periférica para detectar células cancerosas. En divulgaciones particulares, la citometría de flujo se usa para detectar o controlar la presencia de células cancerosas en la médula ósea. En algunas divulgaciones, se usa detección inmunológica multiparamétrica mediante citometría de flujo para detectar células cancerosas (véase, por ejemplo, Coustan-Smith *et al.*, (1998) *Lancet* 351:550-554). En algunas divulgaciones, se usa detección inmunológica multiparamétrica mediante citometría de masas para detectar células cancerosas. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, pueden usarse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 parámetros para detectar células cancerosas. Los antígenos utilizados para la detección se seleccionan basándose en el cáncer que se está detectando (Foon y Todd (1986) *Blood* 68: 1-31). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, La MRD se describe como sujetos que no tienen evidencia de CLL en sangre periférica o médula, es decir, CR o PR basadas en linfadenopatía residual o esplenomegalia. En algunas divulgaciones, la MRD se mide mediante citometría de flujo de sangre periférica y secuenciación profunda de IgHV de médula ósea.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la médula ósea se recoge mediante aspirados de médula ósea o biopsias de médula ósea, y los linfocitos se aíslan para su análisis. Pueden usarse anticuerpos monoclonales y/o policlonales conjugados con un fluorocromo (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina, proteína de clorofila de peridina o biotina) para detectar epítomos, tales como la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT), CD3, CD10, CD11c, CD13, CD14, CD33, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD34, CD45, CD56, CD79b, IgM y/o KORS3544, en linfocitos aislados. Después, las células marcadas pueden detectarse mediante citometría de flujo, tal como citometría de flujo multiparamétrica o la citometría de masas, para detectar múltiples epítomos.

Las células linfoides pueden identificarse y seleccionarse basándose en un gráfico de puntos de dispersión de luz y, después, pueden seleccionarse secundariamente para identificar poblaciones celulares que expresan las características inmunofenotípicas de interés. Se exponen epítomos ilustrativos en la **Tabla 2** a continuación. Otra clasificación inmunológica de leucemias y linfomas se proporciona en Foon y Todd (*Blood* (1986) 68(1): 1-31). En algunas divulgaciones, la evaluación por citometría de flujo de la MRD puede conseguirse cuantificando linfocitos vivos que portan uno o más inmunofenotipos de CLL (por ejemplo, dispersión frontal/lateral baja; CD3^{neg}; CD5⁺; CD14^{neg}; CD19⁺; CD23⁺; CD45⁺; CD56^{neg}).

Tabla 2. Características de inmunofenotipo y citogenética de ejemplo		
Enfermedad	Inmunofenotipo	Citogenética
Leucemia linfocítica crónica (CLL)	Pan-B+; CD5+; CD23+; CD79b/CD22 débil; FMC7-; slg débil	Trisomía 12
		del(13)(q14.3)
		del 11q22-q23
		del 17p13 (p53)
		t(11;14)(q13;q32)
		Reordenamiento de BCL1/IgH
		t(14;19)(q32;q13)
		Deleción de IgH (14q32)
		del(6q)
		+8q24
		+3
Linfoma linfocítico de células pequeñas (SLL)	Pan-B+; CD5+; CD23+; CD10-; slgM+ muy débil	+18
		del 6q21
		del(6)(q21-23)
+: positivo en >90 % de los casos +/-: positivo en más del 50 % de los casos -/+ : positivo en menos del 50 % de los casos -: positivo en <10 % de los casos Marcadores Pan-B: por ejemplo, CD19, CD20, CD79a slG: inmunoglobulinas de superficie cvlg: inmunoglobulinas citoplasmáticas		

En algunas divulgaciones, la secuenciación profunda del locus de la cadena pesada de inmunoglobulina (IGH, por sus siglas en inglés) de los linfocitos B recogidos puede usarse para detectar la enfermedad residual mínima (MRD). La presencia clonal de un reordenamiento de IgG particular puede proporcionar un marcador para detectar la presencia de neoplasias malignas de linfocitos B, tales como CLL y/o presencia residual de células malignas de la misma. En algunas divulgaciones, las células, tales como una población que contiene o se sospecha que contiene linfocitos B, se recogen y aíslan de la sangre. En algunas divulgaciones, las células se recogen y se aíslan de médula ósea, por ejemplo, de aspirados de médula ósea o biopsias de médula ósea y/o de otras muestras biológicas. En algunas divulgaciones, la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) se consigue usando cebadores para secuencias altamente conservadas dentro de las regiones V y J del locus génico, que pueden usarse para identificar poblaciones clonales de células con fines de evaluación de la enfermedad residual mínima. Pueden usarse otros métodos para detectar poblaciones clonales, tales como enfoques de secuenciación de una única célula, incluyendo aquellos que proporcionan información con respecto al número de células de un linaje particular y/o que expresan una cadena variable particular tal como cadena pesada variable o sitio de unión de la misma, tal como una población clonal. En algunas divulgaciones, el ADN de IGH se amplifica usando cebadores degenerados o cebadores que reconocen regiones de cadenas variables compartidas entre diferentes clones celulares, tales como aquellas que reconocen la región de consenso V y la región de consenso degenerada J de la secuencia de IGH. Una secuencia de ejemplo de la región V es ACACGGCCTCGTGTATTACTGT (SEQ ID NO: 57). Una secuencia consenso degenerada de ejemplo de la región J es ACCTGAGGAGACGGTGACC (SEQ ID NO: 58).

El producto de PCR o el resultado de secuenciación en algunas divulgaciones son específicos del alelo reorganizado y sirven como marcadores clonales para la detección de MRD. Después de la amplificación por PCR de la región CDR3, los productos de PCR pueden secuenciarse para producir oligonucleótidos específicos de paciente contruidos como sondas para PCR específica de alelo para la detección sensible de MRD después del tratamiento de neoplasias malignas de linfocitos B con terapia de linfocitos T-CAR, por ejemplo, terapia de linfocitos T CAR CD19. En los casos que se divulgan en el presente documento en los que no se genera un producto de PCR usando los cebadores de consenso, en su lugar pueden usarse cebadores específicos de la familia de la región V para la región marco conservada 1.

En algunas divulgaciones, la persistencia de células tumorales detectables por PCR, tales como células de la neoplasia maligna de linfocitos B, tal como la CLL, tales como secuencias de IGH detectables que corresponden a las secuencias de IGH malignas o clonales, después del tratamiento, se asocia a un mayor riesgo de recaída. En algunas divulgaciones, los pacientes negativos para secuencias de IGH malignas después del tratamiento (en algunas divulgaciones, incluso en el contexto de otros criterios que indican enfermedad progresiva o sólo una respuesta parcial, tales como la persistencia de ganglios linfáticos agrandados u otros criterios que pueden asociarse en algunos contextos a la enfermedad o la falta de respuesta completa) pueden considerarse que tienen una mayor probabilidad de entrar en CR o CR duradera o supervivencia prolongada, en comparación con los pacientes con secuencias de IGH malignas persistentes. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, dichas determinaciones de

pronóstico y estadificación son particularmente relevantes para tratamientos en los que se observa la eliminación de células malignas dentro de un período de tiempo corto después de la administración de la terapia, por ejemplo, en comparación con la resolución de otros síntomas clínicos tales como el tamaño de los ganglios linfáticos u otros criterios de estadificación. Por ejemplo, en algunas de dichas divulgaciones, la ausencia de IGH detectable o enfermedad residual mínima en una muestra tal como la médula ósea puede ser una lectura preferida para la respuesta o probabilidad de respuesta o durabilidad de la misma, en comparación con otros enfoques de estadificación o pronóstico disponibles. En algunas divulgaciones, los resultados de MRD, por ejemplo, la información de secuenciación profunda de IGH, puede informar de una intervención adicional o la falta de la misma. Por ejemplo, los métodos y otros casos que se divulgan en el presente documento en algunos contextos proporcionan que un sujeto considerado negativo para IGH maligna puede, en algunas divulgaciones, no tratarse adicionalmente o no recibir adicionalmente una dosis de la terapia que se divulga, o que al sujeto se le administre una dosis más baja o reducida. Por el contrario, se puede divulgar o especificar que un sujeto que presenta MRD a través de secuenciación profunda de IGH se trate adicionalmente, por ejemplo, con la terapia administrada inicialmente a una dosis similar o superior o con un tratamiento adicional. En algunas divulgaciones, la enfermedad o afección persiste después de la administración de la primera dosis y/o la administración de la primera dosis no es suficiente para erradicar la enfermedad o afección en el sujeto.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el método reduce la carga de enfermedad o afección, por ejemplo, el número de células tumorales, el tamaño del tumor, la duración de la supervivencia del paciente o la supervivencia sin acontecimientos, en mayor grado y/o durante un período de tiempo mayor en comparación con la reducción que se observaría con un método comparable usando una pauta posológica alternativa, tal como una en la que el sujeto recibe uno o más agentes terapéuticos alternativos y/o una en la que el sujeto no recibe una dosis de células y/o un agente de agotamiento linfóide de acuerdo con los métodos que se divulgan, y/o con los artículos de fabricación o composiciones que se divulgan. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, se detecta, se evalúa o se mide la carga de una enfermedad o afección en el sujeto. La carga de enfermedad puede detectarse en algunas divulgaciones detectando el número total de células de enfermedad o asociadas a enfermedad, por ejemplo, células tumorales, en el sujeto, o en un órgano, tejido o fluido corporal del sujeto, tal como sangre o suero. En algunas divulgaciones, se evalúa la supervivencia del sujeto, la supervivencia dentro de un período de tiempo determinado, el grado de supervivencia, la presencia o duración de la supervivencia sin acontecimientos o síntomas, o supervivencia sin recaídas. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, se evalúa cualquier síntoma de la enfermedad o afección. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, se especifica la medida de carga de enfermedad o afección.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, después del tratamiento mediante el método, la probabilidad de recaída se reduce en comparación con otros métodos, por ejemplo, métodos en los que el sujeto recibe uno o más agentes terapéuticos alternativos y/o uno en el que el sujeto no recibe una dosis de células y/o un agente de agotamiento linfóide de acuerdo con los métodos que se divulgan, y/o con los artículos de fabricación o composiciones que se divulgan.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la farmacocinética de las células administradas, por ejemplo, las células transferidas adoptivamente se determinan para evaluar la disponibilidad, por ejemplo, la biodisponibilidad de las células administradas. Los métodos para determinar la farmacocinética de células transferidas adoptivamente pueden incluir extraer sangre periférica de sujetos a los que se les han administrado células modificadas por ingeniería genética y determinar el número o relación de las células modificadas por ingeniería genética en la sangre periférica. Los enfoques para seleccionar y/o aislar células pueden incluir el uso de anticuerpos específicos de receptor de antígeno quimérico (CAR) (por ejemplo, Brentjens *et al.*, *Sci. Transl. Med.* Marzo de 2013; 5(177): 177ra38) Proteína L (Zheng *et al.*, *J. Transl. Med.* Febrero de 2012; 10:29), marcadores de epítomos, tales como secuencias Strep-Tag, introducidos directamente en sitios específicos en el CAR, por lo que se usan reactivos de unión para Strep-Tag para evaluar directamente el CAR (Liu *et al.* (2016) *Nature Biotechnology*, 34:430; Publicación de Solicitud de Patente Internacional N.º WO2015095895) y anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a un polipéptido CAR (véase la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N.º WO2014190273). En algunos casos que se divulgan en el presente documento pueden utilizarse genes marcadores extrínsecos en relación con terapias celulares modificadas por ingeniería genética para permitir la detección o selección de células y, en algunos casos que se divulgan en el presente documento, también para promover el suicidio celular. Un receptor de factor de crecimiento epidérmico truncado (EGFRt, por sus siglas en inglés) en algunos casos que se divulgan en el presente documento puede coexpresarse con un transgén de interés (un CAR o TCR) en células transducidas (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 8.802.374). El EGFRt puede contener un epítipo reconocido por el anticuerpo cetuximab (Erbix®) u otro anticuerpo anti-EGFR terapéutico o molécula de unión, que puede usarse para identificar o seleccionar células que se han modificado por ingeniería genética con la construcción de EGFRt y otro receptor recombinante, tal como un receptor de antígeno quimérico (CAR), y/o para eliminar o separar las células que expresan el receptor. Véase la Patente de los EE.UU. N.º 8.802.374 y Liu *et al.*, *Nature Biotech.* Abril de 2016; 34(4): 430-434).

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el número de linfocitos T CAR⁺ en una muestra biológica obtenida del paciente, por ejemplo, sangre, puede determinarse en un período de tiempo después de la administración de la terapia celular, por ejemplo, para determinar la farmacocinética de las células. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el número de linfocitos T CAR⁺, opcionalmente linfocitos T CAR⁺ CD8⁺ y/o linfocitos T CAR⁺

CD4⁺, detectables en la sangre del sujeto, o en la mayoría de los sujetos tratados de este modo mediante el método, es superior a 1 célula por µl, superior a 5 células por µl o superior a 10 células por µl.

D. Toxicidad

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos que se divulgan se diseñan para o incluyen características que dan como resultado una tasa más baja y/o un grado más bajo de toxicidad, resultado o síntoma tóxico, perfil, factor o propiedad que promueve la toxicidad, tal como un síntoma o resultado asociado a o indicativo del síndrome de liberación de citocinas (CRS) o neurotoxicidad, por ejemplo, en comparación con la administración de una terapia celular alternativa, tal como una composición de linfocitos T CAR⁺ alternativa y/o una dosificación alternativa de células, por ejemplo, una dosificación de células que no se administra en una relación definida.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos que se divulgan no dan como resultado una tasa o probabilidad alta de toxicidad o resultados tóxicos, o reducen la tasa o probabilidad de toxicidad o resultados tóxicos, tales como neurotoxicidad (NT), síndrome de liberación de citocinas (CRS), tal como en comparación con otras terapias celulares determinadas. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos no dan como resultado, o no aumentan el riesgo de, NT grave (sNT), CRS grave (sCRS), síndrome de activación de macrófagos, síndrome de lisis tumoral, fiebre de al menos o aproximadamente 38 grados Celsius durante tres o más días y un nivel plasmático de CRP (proteína C reactiva, por sus siglas en inglés) de al menos o aproximadamente 20 mg/dl. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, más de o más de aproximadamente el 30 %, 35 %, 40 %, 50 %, 55 %, 60 % o más de los sujetos tratados de acuerdo con los métodos que se divulgan no presentan ningún grado de CRS ni ningún grado de neurotoxicidad. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, no más del 50 % de los sujetos tratados (por ejemplo, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % o más de los sujetos tratados) presentan un síndrome de liberación de citocinas (CRS) superior al grado 2 y/o una neurotoxicidad superior al grado 2. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, al menos el 50 % de los sujetos tratados de acuerdo con el método (por ejemplo, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % o más de los sujetos tratados) no presentan un resultado tóxico grave (por ejemplo, CRS grave o neurotoxicidad grave), de manera que no presentan neurotoxicidad de grado 3 o superior y/o no presentan CRS grave, o no lo hacen dentro de un determinado período de tiempo después del tratamiento, tal como a una semana, dos semanas o un mes de la administración de las células. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, más de o más de aproximadamente el 30 %, 35 %, 40 %, 50 %, 55 %, 60 % o más de los sujetos que habían fracasado tanto en una terapia anterior con un inhibidor de BTK (por ejemplo, ibrutinib) como con venetoclax, tratados de acuerdo con los métodos que se divulgan, no presentan ningún grado de CRS ni ningún grado de neurotoxicidad. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, no más del 50 % de los sujetos tratados (por ejemplo, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % o más de los sujetos tratados que habían fracasado tanto en una terapia anterior con un inhibidor de BTK (por ejemplo, ibrutinib) como con venetoclax) presentan un síndrome de liberación de citocinas (CRS) superior al grado 2 y/o una neurotoxicidad superior al grado 2. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, al menos el 50 % de los sujetos que habían fracasado tanto en una terapia anterior con un inhibidor de BTK (por ejemplo, ibrutinib) como con venetoclax, tratados de acuerdo con el método (por ejemplo, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % o más de los sujetos tratados) no presentan un resultado tóxico grave (por ejemplo, CRS grave o neurotoxicidad grave), de manera que no presentan neurotoxicidad de grado 3 o superior y/o no presentan CRS grave, o no lo hacen dentro de un determinado período de tiempo después del tratamiento, tal como a una semana, dos semanas o un mes de la administración de las células. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los parámetros evaluados para determinar determinadas toxicidades incluyen acontecimientos adversos (AE, por sus siglas en inglés), acontecimientos adversos emergentes del tratamiento, toxicidades limitantes de la dosis (DLT, por sus siglas en inglés), CRS, acontecimientos neurológicos y NT.

La administración de terapia adoptiva de linfocitos T, tal como el tratamiento con linfocitos T que expresan receptores de antígenos quiméricos, puede inducir efectos tóxicos o resultados tales como el síndrome de liberación de citocinas y la neurotoxicidad. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, dichos efectos o resultados son paralelos a niveles altos de citocinas circulantes, que pueden ser subyacentes a la toxicidad observada.

En algunas divulgaciones, el resultado tóxico es o se asocia a o es indicativo del síndrome de liberación de citocinas (CRS) o CRS grave (sCRS). Puede ocurrir CRS, por ejemplo, sCRS, en algunos casos que se divulgan en el presente documento después de la terapia adoptiva de linfocitos T y la administración a sujetos de otros productos biológicos. Véase Davila *et al.*, *Sci Transl Med* 6, 224ra25 (2014); Brentjens *et al.*, *Sci. Transl. Med.* 5, 177ra38 (2013); Grupp *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 368, 1509-1518 (2013); y Kochenderfer *et al.*, *Blood* 119, 2709-2720 (2012); Xu *et al.*, *Cancer Letters* 343 (2014) 172-78.

Normalmente, la CRS es provocada por una respuesta inmunitaria sistémica exagerada mediada por, por ejemplo, linfocitos T, linfocitos B, linfocitos NK, monocitos y/o macrófagos. Dichas células pueden liberar una gran cantidad de mediadores inflamatorios tales como citocinas y quimiocinas. Las citocinas pueden desencadenar una respuesta inflamatoria aguda y/o inducir daño de órganos endoteliales, lo que puede dar como resultado una fuga microvascular, insuficiencia cardíaca o muerte. La CRS grave potencialmente mortal puede provocar infiltración pulmonar y lesión pulmonar, insuficiencia renal o coagulación intravascular diseminada. Otras toxicidades graves potencialmente

mortales pueden incluir toxicidad cardíaca, dificultad respiratoria, toxicidad neurológica y/o insuficiencia hepática.

La CRS puede tratarse usando una terapia antiinflamatoria tal como una terapia anti-IL-6, por ejemplo, anticuerpo anti-IL-6, por ejemplo, tocilizumab, o antibióticos u otros agentes como se describe. Los resultados, los signos y los síntomas de CRS se conocen e incluyen aquellos que se describen en el presente documento. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, cuando una pauta posológica o administración particular efectúa o no efectúa un resultado, signo o síntoma asociado a CRS dado, pueden especificarse resultados, signos y síntomas particulares y/o cantidades o grados de los mismos.

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

Los resultados de ejemplo asociados a CRS incluyen fiebre, tiritera, escalofríos, hipotensión, disnea, síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS, por sus siglas en inglés), encefalopatía, elevación de ALT/AST, insuficiencia renal, trastornos cardíacos, hipoxia, alteraciones neurológicas y muerte. Las complicaciones neurológicas incluyen delirio, actividad similar a una crisis epiléptica, confusión, dificultad para encontrar palabras, afasia y/u obnubilación. Otros resultados relacionados con la CRS incluyen fatiga, náuseas, cefalea, crisis epiléptica, taquicardia, mialgias, erupciones, síndrome de fuga vascular aguda, deterioro de la función hepática e insuficiencia renal. En algunas divulgaciones, la CRS se asocia a un aumento de uno o más factores tales como la ferritina sérica, dímero d, aminotransferasas, lactato deshidrogenasa y triglicéridos, o a hipofibrinogenemia o hepatoesplenomegalia. Otros signos o síntomas de ejemplo asociados a CRS incluyen inestabilidad hemodinámica, neutropenia febril, aumento de la proteína C reactiva (CRP), cambios en los parámetros de coagulación (por ejemplo, relación internacional normalizada (INR, por sus siglas en inglés), tiempo de protrombina (PTI, por sus siglas en inglés) y/o fibrinógeno), cambios en la función cardíaca y de otros órganos, y/o recuento absoluto de neutrófilos (ANC, por sus siglas en inglés).

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los resultados asociados a CRS incluyen uno o más de: fiebre persistente, por ejemplo, fiebre de una temperatura especificada, por ejemplo, superior a exactamente o aproximadamente 38 grados Celsius, durante dos o más, por ejemplo, tres o más, por ejemplo, cuatro o más días o durante al menos tres días consecutivos; fiebre superior a exactamente o aproximadamente 38 grados Celsius; elevación de citocinas, tal como un factor de cambio máximo, por ejemplo, de al menos exactamente o aproximadamente 75, en comparación con los niveles de pretratamiento de al menos dos citocinas (por ejemplo, al menos dos del grupo que consiste en interferón gamma (IFN γ), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, fracktalquina e IL-5, y/o factor de necrosis tumoral alfa (TNF α)), o un factor de cambio máximo, por ejemplo, de al menos exactamente o aproximadamente 250 de al menos una de dichas citocinas; y/o al menos un signo clínico de toxicidad, tal como hipotensión (por ejemplo, medida mediante al menos un vasopresor intravenoso vasoactivo); hipoxia (por ejemplo, niveles de oxígeno en plasma (PO₂) de menos de exactamente o aproximadamente el 90 %); y/o uno o más trastornos neurológicos (incluyendo cambios en el estado mental, obnubilación y crisis epilépticas).

Los resultados relacionados con CRS de ejemplo incluyen niveles séricos aumentados o altos de uno o más factores, incluyendo citocinas y quimiocinas y otros factores asociados a CRS. Los resultados de ejemplo incluyen además aumentos en la síntesis o secreción de uno o más de dichos factores. Dicha síntesis o secreción puede ser por el linfocito T o una célula que interactúa con el linfocito T, tal como una célula inmunitaria innata o linfocito B.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los factores séricos asociados a CRS o los resultados relacionados con CRS incluyen citocinas y/o quimiocinas inflamatorias, incluyendo interferón gamma (IFN- γ), TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, sIL-2Ra, factor estimulante de colonias de granulocitos (GM-CSF), proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-1, factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), IL-6 e IL-10, IL-1 β , IL-8, IL-2, MIP-1, Flt-3L, fracktalquina y/o IL-5. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el factor o resultado incluye proteína C reactiva (CRP). Además de ser un factor de riesgo precoz y fácilmente medible para CRS, la CRP también es un marcador para la expansión celular. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los sujetos que se mide que tienen niveles altos de PCR, tales como ≥ 15 mg/dl, tienen CRS. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los sujetos que se miden que tienen niveles altos de CRP no tienen CRS. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, una medida de CRS incluye una medida de CRP y otro factor indicativo de CRS.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, se controlan una o más citocinas o quimiocinas inflamatorias antes, durante o después del tratamiento con CAR. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, se evalúa o controla TNF-alfa o IL-16 en un sujeto, tal como de acuerdo con los métodos del presente documento.

Se han desarrollado criterios de CRS que parecen correlacionarse con la aparición de CRS para predecir qué

pacientes tienen más probabilidades de estar en riesgo de desarrollar sCRS (véase Davilla *et al. Science translational medicine*. 2014;6(224):224ra25). Los factores incluyen fiebres, hipoxia, hipotensión, cambios neurológicos, niveles séricos elevados de citocinas inflamatorias, tales como un conjunto de siete citocinas (IFN γ , IL-5, IL-6, IL-10, Flt-3L, fractalcina y GM-CSF) cuya elevación inducida por el tratamiento puede correlacionarse bien tanto con la carga tumoral anterior al tratamiento como con los síntomas de sCRS. Se conocen otras directrices sobre el diagnóstico y manejo de CRS (véase, por ejemplo, Lee *et al., Blood*. 2014;124(2):188-95). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los criterios que reflejan el grado de CRS son aquellos detallados en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3: Criterios de clasificación de ejemplo para CRS	
Grado	Descripción de los síntomas
1 Leves	No potencialmente mortales, requieren solamente tratamiento sintomático tal como antipiréticos y antieméticos (por ejemplo, fiebre, náuseas, fatiga, cefalea, mialgias, malestar)
2 Moderados	Requieren y responden a una intervención moderada:
	• Requerimiento de oxígeno < 40 %, o
	• Hipotensión que responde a fluidos o dosis bajas de un único vasopresor, o
3 Graves	• Toxicidad orgánica de grado 2 (según CTCAE v4.0)
	Requieren y responden a una intervención agresiva:
	• Requerimiento de oxígeno $\geq$ 40 %, o
	• Hipotensión que requiere una dosis alta de un único vasopresor (por ejemplo, norepinefrina $\geq$ 20 μ g/kg/min, dopamina $\geq$ 10 μ g/kg/min, fenilefrina $\geq$ 200 μ g/kg/min o epinefrina $\geq$ 10 μ g/kg/min), o
	• Hipotensión que requiere múltiples vasopresores (por ejemplo, vasopresina + uno de los agentes anteriores, o vasopresores combinados equivalentes a $\geq$ 20 μ g/kg/min de norepinefrina), o
	• Toxicidad orgánica de grado 3 o transaminitis de grado 4 (según CTCAE v4.0)
4	Potencialmente mortales:
Potencialmente mortales	• Requerimiento de soporte con ventilador, o
	• Toxicidad orgánica de grado 4 (excluyendo transaminitis)
5 Mortales	Muerte

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los resultados asociados a CRS grave o CRS de grado 3 o superior, tal como de grado 4 o superior, incluyen uno o más de: fiebre persistente, por ejemplo, fiebre de una temperatura especificada, por ejemplo, superior a exactamente o aproximadamente 38 grados Celsius, durante dos o más, por ejemplo, tres o más, por ejemplo, cuatro o más días o durante al menos tres días consecutivos; fiebre superior a exactamente o aproximadamente 38 grados Celsius; elevación de citocinas, tal como un factor de cambio máximo, por ejemplo, de al menos exactamente o aproximadamente 75, en comparación con los niveles de pretratamiento de al menos dos citocinas (por ejemplo, al menos dos del grupo que consiste en interferón gamma (IFN γ), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, fractalcina e IL-5, y/o factor de necrosis tumoral alfa (TNF α)), o un factor de cambio máximo, por ejemplo, de al menos exactamente o aproximadamente 250 de al menos una de dichas citocinas; y/o al menos un signo clínico de toxicidad, tal como hipotensión (por ejemplo, medida mediante al menos un vasopresor intravenoso vasoactivo); hipoxia (por ejemplo, niveles de oxígeno en plasma (PO₂) de menos de exactamente o aproximadamente el 90 %); y/o uno o más trastornos neurológicos (incluyendo cambios en el estado mental, obnubilación y crisis epilépticas). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la CRS grave incluye CRS que requiere el manejo o cuidado en la unidad de cuidados intensivos (UCI).

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la CRS, tal como la CRS grave, abarca una combinación de (1) fiebre persistente (fiebre de al menos 38 grados Celsius durante al menos tres días) y (2) un nivel sérico de CRP de al menos exactamente o aproximadamente 20 mg/dl. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la CRS abarca hipotensión que requiere el uso de dos o más vasopresores o insuficiencia respiratoria que requiere ventilación mecánica. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosificación de vasopresores aumenta en una segunda o posterior administración.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la CRS grave o CRS de grado 3 abarca un aumento de la alanina aminotransferasa, un aumento de la aspartato aminotransferasa, escalofríos, neutropenia febril, cefalea, disfunción del ventrículo izquierdo, encefalopatía, hidrocefalia y/o temblor.

Puede especificarse el método de medición o detección de los diversos resultados.

En algunas divulgaciones, el resultado tóxico es o se asocia a neurotoxicidad. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los síntomas asociados a un riesgo clínico de neurotoxicidad incluyen confusión, delirios, afasia, afasia expresiva, obnubilación, mioclonos, letargia, estado mental alterado, convulsiones, actividad similar a una crisis epiléptica, crisis epilépticas (opcionalmente confirmadas por electroencefalograma [EEG]), niveles elevados de

amiloide beta (A β), niveles elevados de glutamato y niveles elevados de radicales de oxígeno. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la neurotoxicidad se clasifica basándose en la gravedad (por ejemplo, usando una escala de Grado 1-5 (véase, por ejemplo, Guido Cavaletti y Paola Marmioli *Nature Reviews Neurology* 6, 657-666 (Diciembre de 2010); *National Cancer Institute-Common Toxicity Criteria version 4.03* (NCI-CTCAE v4.03).

En algunos casos, los síntomas neurológicos pueden ser los primeros síntomas de la sCRS. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, se observa que los síntomas neurológicos comienzan de 5 a 7 días después de la infusión de terapia celular. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la duración de los cambios neurológicos puede variar de 3 a 19 días. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la recuperación de los cambios neurológicos se produce después de que se hayan resuelto otros síntomas de sCRS. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el tiempo o el grado de resolución de los cambios neurológicos no se acelera por el tratamiento con anti-IL-6 y/o uno o más esteroides.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, se considera que un sujeto desarrolla "neurotoxicidad grave" en respuesta a o secundaria a la administración de una terapia celular o dosis de células de la misma, si, después de la administración, el sujeto muestra síntomas que limitan el autocuidado (por ejemplo, bañarse, vestirse y desvestirse, alimentarse, usar el baño, tomar medicamentos) de entre: 1) síntomas de neuropatía motora periférica, incluyendo inflamación o degeneración de los nervios motores periféricos; 2) síntomas de neuropatía sensorial periférica, incluyendo inflamación o degeneración de los nervios sensoriales periféricos, disestesia, tal como distorsión de la percepción sensorial, dando como resultado una sensación anormal y desagradable, neuralgia, tal como una sensación dolorosa intensa a lo largo de un nervio o un grupo de nervios, y/o parestesia, tal como alteraciones funcionales de las neuronas sensoriales que dan como resultado sensaciones cutáneas anormales de hormigueo, entumecimiento, presión, frío y calor en ausencia de estímulo. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la neurotoxicidad grave incluye la neurotoxicidad con un grado de 3 o superior, tal como se expone en la Tabla 4.

Tabla 4: Criterios de clasificación de ejemplo para la neurotoxicidad	
Grado	Descripción de los síntomas
1 Asintomáticos o leves	Síntomas leves o asintomáticos
2 Moderados	Presencia de síntomas que limitan las actividades instrumentales de la vida diaria (ADL, por sus siglas en inglés), tales como preparar comidas, comprar comestibles o ropa, usar el teléfono, administrar dinero
3 Graves	Presencia de síntomas que limitan las AVD de autocuidado, tales como bañarse, vestirse y desvestirse, alimentarse a sí mismo, usar el baño, tomando medicamentos
4 Potencialmente mortales	Síntomas que son potencialmente mortales, que requieren una intervención urgente
5 Mortales	Muerte

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos reducen los síntomas asociados a CRS o neurotoxicidad en comparación con otros métodos. En algunas divulgaciones, los métodos que se divulgan reducen los síntomas, resultados o factores asociados a CRS, incluyendo síntomas, resultados o factores asociados a CRS grave o CRS de grado 3 o superior, en comparación con otros métodos. Por ejemplo, los sujetos tratados de acuerdo con los presentes métodos pueden carecer de síntomas, resultados o factores detectables y/o reducidos de CRS, por ejemplo, CRS grave o CRS de grado 3 o superior, tales como cualesquiera que se describen, por ejemplo, se exponen en la Tabla 3. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los sujetos tratados de acuerdo con los presentes métodos pueden tener síntomas reducidos de neurotoxicidad, tales como debilidad o entumecimiento de las extremidades, pérdida de memoria, visión y/o intelecto, comportamientos obsesivos y/o compulsivos incontrolables, delirio confusional, cefalea, problemas cognitivos y conductuales, incluyendo pérdida del control motor, deterioro cognitivo y disfunción del sistema nervioso autónomo, y disfunción sexual, en comparación con los sujetos tratados mediante otros métodos. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los sujetos tratados de acuerdo con los presentes métodos pueden tener síntomas reducidos asociados a neuropatía motora periférica, neuropatía sensorial periférica, disestesia, neuralgia o parestesia.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos reducen los resultados asociados a la neurotoxicidad, incluyendo los daños del sistema nervioso y/o el cerebro, tales como la muerte de las neuronas. En algunas divulgaciones, los métodos reducen el nivel de factores asociados a la neurotoxicidad tales como amiloide beta (A β), glutamato y radicales de oxígeno.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el resultado de toxicidad es una toxicidad limitante de la dosis (DLT). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el resultado tóxico es una toxicidad limitante de la dosis. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el resultado tóxico es la ausencia de una toxicidad limitante de la dosis. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, una toxicidad limitante de la dosis (DLT) se define como cualquier toxicidad de grado 3 o superior evaluada mediante cualesquier directrices conocidas o publicadas para evaluar la toxicidad particular, tales como cualesquiera descritas anteriormente e incluyendo los Criterios de Terminología Común para Acontecimientos Adversos (CTCAE) del Instituto Nacional del Cáncer (NCI, por sus siglas en inglés) versión 4.0.

En algunas divulgaciones, una DLT puede describirse como cualesquier AE de grado 4 o 5 emergentes del tratamiento, excepto aquellos enumerados en las excepciones a continuación; cualesquier AE de grado 3 emergentes del tratamiento que no se resuelvan a grado ≤ 2 en 7 días, excepto aquellos enumerados en las excepciones a continuación; cualesquier crisis epilépticas de grado 3 emergentes del tratamiento que no se resuelvan a grado ≤ 2 en 3 días; y cualquier grado de toxicidad autoinmunitaria emergente del tratamiento ≥ 3 , con la excepción de la aplasia de linfocitos B (que es un riesgo esperado asociado a la administración de células modificadas por ingeniería genética); las excepciones que se enumeran a continuación no se consideran DLT: cualquier AE emergente del tratamiento que claramente no esté relacionado con la administración de las células modificadas por ingeniería genética (por ejemplo, accidente de vehículo de motor); toxicidades por infusión de grado 4 que son reversibles a grado ≤ 2 en 8 horas; fiebre de grado 3 o 4 o neutropenia febril durante ≤ 2 semanas; transaminitis de grado 4 que se considera un síntoma de CRS; transaminitis de grado 3 durante ≤ 2 semanas; dolor óseo de grado 3 debido a la expansión de linfocitos T en los compartimentos de la médula durante ≤ 2 semanas; TLS de grado 3 o 4 durante ≤ 7 días; hipotensión de grado 3 o 4 (sin otros síntomas de CRS) que requiere un único vasopresor para soporte que se resuelve a grado < 3 en ≤ 72 horas; CRS de grado 3 o 4 con hipotensión sola que requiere un único vasopresor para soporte (que no requiere intubación) que se resuelve a grado < 3 en ≤ 72 horas, o CRS de grado 3 con gravedad basada en transaminitis de grado 4; encefalopatía de grado 3 o 4 durante ≤ 7 días que se resuelve al valor basal en ≤ 14 días desde el comienzo del acontecimiento de grado ≥ 3 ; escalofríos de grado 3; linfopenia de grado 3 o 4; leucopenia de grado 3 o 4; anomalías electrolíticas asintomáticas de grado 3 o 4 que se resuelven con reemplazo; trombocitopenia de grado 3 o 4; anemia de grado 3 o 4; y aplasia de linfocitos B de grado 3 o 4 e hipogammaglobulinemia.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la tasa, riesgo o probabilidad bajos de desarrollar una toxicidad, por ejemplo, CRS o neurotoxicidad o CRS o neurotoxicidad graves, por ejemplo, CRS o neurotoxicidad de

grado 3 o superior, observados con la administración de una dosis de linfocitos T de acuerdo con los métodos que se divulgan y/o con los artículos de fabricación o composiciones que se divulgan, permiten la administración de la terapia celular de forma ambulatoria. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la administración de la terapia celular, por ejemplo, la dosis de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T CAR+) de acuerdo con los métodos que se divulgan y/o con los artículos de fabricación o composiciones que se divulgan, se realiza de forma ambulatoria o no requiere la admisión del sujeto en el hospital, tal como la admisión en el hospital que requiere una estancia de una noche.

En algunas divulgaciones, a los sujetos a los que se les administró la terapia celular, por ejemplo, la dosis de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T CAR+) de acuerdo con los métodos que se divulgan y/o con los artículos de fabricación o composiciones que se divulgan, incluyendo los sujetos tratados de forma ambulatoria, no se les administra una intervención para tratar cualquier toxicidad antes de o con la administración de la dosis celular, a menos o hasta que el sujeto presente un signo o síntoma de una toxicidad, tal como una neurotoxicidad o CRS. Se describen agentes de ejemplo para tratar, retrasar, atenuar o mejorar una toxicidad en la Sección II.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, si un sujeto al que se le administra la terapia celular, por ejemplo, una dosis de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T CAR+), incluyendo los sujetos tratados de forma ambulatoria, presenta fiebre, al sujeto se le administra o recibe instrucciones para recibir o administrar un tratamiento para reducir la fiebre. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la fiebre en el sujeto se caracteriza como una temperatura corporal del sujeto que está (o se mide) exactamente o por encima de una determinada temperatura o nivel umbral. En algunas divulgaciones, la temperatura umbral es la asociada a al menos una fiebre baja, a al menos fiebre moderada y/o a al menos fiebre alta. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la temperatura umbral es una temperatura o intervalo particular. Por ejemplo, la temperatura umbral puede ser de exactamente o aproximadamente o al menos exactamente o aproximadamente 38, 39, 40, 41 o 42 grados Celsius, y/o puede estar en un intervalo de exactamente o aproximadamente 38 grados Celsius a exactamente o aproximadamente 39 grados Celsius, un intervalo de exactamente o aproximadamente 39 grados Celsius a exactamente o aproximadamente 40 grados Celsius, un intervalo de exactamente o aproximadamente 40 grados Celsius a exactamente o aproximadamente 41 grados, o un intervalo de exactamente o aproximadamente 41 grados Celsius a exactamente o aproximadamente 42 grados Celsius.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el tratamiento diseñado para reducir la fiebre incluye el tratamiento con un antipirético. Un antipirético puede incluir cualquier agente, por ejemplo, compuesto, composición o ingrediente, que reduce la fiebre, tal como uno de cualquier número de agentes conocidos por tener efectos antipiréticos, tales como los AINE (tales como ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno y nimesulida), salicilatos, tales como aspirina, salicilato de colina, salicilato de magnesio y salicilato de sodio, paracetamol, acetaminofeno, Metamizol, Nabumetona, Fenaxona, antipirina, febrífugos. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el antipirético es acetaminofeno. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el acetaminofeno puede administrarse a una dosis de 12,5 mg/kg por vía oral o por vía intravenosa hasta cada cuatro horas. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, es o comprende ibuprofeno o aspirina.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, si la fiebre es una fiebre sostenida, al sujeto se le administra un tratamiento alternativo para tratar la toxicidad, tal como cualquiera que se describe en la Sección II a continuación. Para sujetos tratados de forma ambulatoria, se instruye al sujeto para que regrese al hospital si el sujeto tiene y/o se determina que tiene fiebre sostenida. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el sujeto tiene, y/o se determina o se considera que tiene, una fiebre sostenida si él o ella presenta fiebre exactamente o por encima de la temperatura umbral relevante, y donde la fiebre o la temperatura corporal del sujeto no se reduce, o no se reduce en o en más de una cantidad especificada (por ejemplo, en más de 1 °C, y generalmente no fluctúa en aproximadamente, o en más de aproximadamente, 0,5 °C, 0,4 °C, 0,3 °C o 0,2 °C), después de un tratamiento específico, tal como un tratamiento diseñado para reducir la fiebre tal como un tratamiento con un antipirético, por ejemplo, AINE o salicilatos, por ejemplo, ibuprofeno, acetaminofeno o aspirina. Por ejemplo, se considera que un sujeto tiene fiebre sostenida si él o ella presenta o se determina que presenta una fiebre de al menos exactamente o aproximadamente 38 o 39 grados Celsius, que no se reduce en o no se reduce en más de exactamente o aproximadamente 0,5 °C, 0,4 °C, 0,3 °C o 0,2 °C, o en exactamente o aproximadamente el 1 %, 2 %, 3 %, 4 % o 5 %, durante un período de 6 horas, durante un período de 8 horas, o durante un período de 12 horas, o durante un período de 24 horas, incluso después del tratamiento con el antipirético tal como acetaminofeno. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosificación del antipirético es una dosificación habitualmente eficaz en un sujeto para reducir la fiebre o la fiebre de un tipo particular, tal como la fiebre asociada a una infección bacteriana o vírica, por ejemplo, una infección localizada o sistémica.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el sujeto tiene, y/o se determina o se considera que tiene, una fiebre sostenida si él o ella presenta fiebre exactamente o por encima de la temperatura umbral relevante, y donde la fiebre o la temperatura corporal del sujeto no fluctúa en aproximadamente, o en más de aproximadamente, 1 °C, y generalmente no fluctúa en aproximadamente, o en más de aproximadamente, 0,5 °C, 0,4 °C, 0,3 °C o 0,2 °C. Dicha ausencia de fluctuación por encima o en una determinada cantidad generalmente se mide durante un período de tiempo dado (tal como durante un período de tiempo de 24 horas, 12 horas, 8 horas, 6 horas, 3 horas o 1 hora, que puede medirse a partir del primer signo de fiebre o la primera temperatura por encima del umbral indicado). Por

ejemplo, en algunos casos que se divulgan en el presente documento, se considera o se determina que un sujeto presenta fiebre sostenida si él o ella presenta una fiebre de al menos exactamente o aproximadamente o al menos exactamente o aproximadamente 38 o 39 grados Celsius, que no fluctúe en temperatura en más de exactamente o aproximadamente 0,5 °C, 0,4 °C, 0,3 °C o 0,2 °C, durante un período de 6 horas, durante un período de 8 horas, o durante un período de 12 horas, o durante un período de 24 horas.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la fiebre es una fiebre sostenida; en algunas divulgaciones, el sujeto se trata en un momento en el que se ha determinado que un sujeto tiene fiebre sostenida, tal como en una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o menos horas de dicha determinación o de la primera determinación de este tipo después de la terapia inicial que tiene el potencial de inducir la toxicidad, tal como la terapia celular, tal como la dosis de los linfocitos T, por ejemplo, linfocitos T CAR+.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, se administra una o más intervenciones o agentes para tratar la toxicidad, tales como terapias dirigidas a la toxicidad, en un momento en el cual o inmediatamente después del cual se determina o se confirma que el sujeto (tal como se determina o se confirma por primera vez) presenta fiebre sostenida, por ejemplo, como se mide de acuerdo con cualquiera de los casos mencionados anteriormente que se divulgan en el presente documento. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la una o más terapias dirigidas a la toxicidad se administran en un determinado período de tiempo de dicha confirmación o determinación, tal como en 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 6 horas u 8 horas de la misma.

E. Biomarcadores

Entre los métodos que se divulgan existen métodos de tratamiento que implican evaluar un riesgo de desarrollar toxicidad asociada a la terapia celular en un sujeto que implica evaluar o detectar biomarcadores (por ejemplo, analitos) o parámetros que se asocian a la toxicidad, *por ejemplo*, neurotoxicidad, tal como neurotoxicidad y/o CRS grave, tal como CRS grave. En algunas divulgaciones, al sujeto se le administra una terapia, por ejemplo, terapia de linfocitos T modificados por ingeniería genética, basándose en la evaluación. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los biomarcadores incluyen TNF-alfa (TNF α) e interleucina-16 (IL-16).

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos implican evaluar o detectar la presencia o ausencia de biomarcadores (por ejemplo, TNF α o IL-16) y/o parámetros (por ejemplo, concentración, cantidad, nivel o actividad) asociados a biomarcadores (por ejemplo, TNF α o IL-16). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos pueden incluir comparar el uno o más parámetros con un valor de referencia particular, tal como un nivel umbral (también denominado "valor umbral" en el presente documento), por ejemplo, aquellos asociados a un riesgo de desarrollar toxicidad, tal como CRS o NT, y/o toxicidad grave, por ejemplo, CRS o NT grave. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos también implican seleccionar sujetos para el tratamiento con una terapia celular basándose en la evaluación de la presencia o ausencia del biomarcador y/o la comparación de los biomarcadores con un valor de referencia o nivel umbral del biomarcador. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos también implican administrar un agente o una terapia que puede tratar, prevenir, retrasar y/o atenuar el desarrollo de la toxicidad, por ejemplo, basándose en la evaluación de la presencia o ausencia del biomarcador y/o la comparación de los biomarcadores con un valor de referencia o nivel umbral del biomarcador.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos implican evaluar el riesgo de desarrollo de una toxicidad, antes y/o después de la administración de una terapia celular. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos implican evaluar el nivel, cantidad o concentración de los biomarcadores (por ejemplo, TNF α o IL-16) en una muestra biológica, en donde la muestra biológica es de un sujeto que es candidato para el tratamiento con la terapia celular, comprendiendo opcionalmente dicha terapia celular una dosis o composición de células modificadas genéticamente que expresan un receptor recombinante; y la muestra biológica se obtiene del sujeto antes de administrar la terapia celular y/o dicha muestra biológica no comprende el receptor recombinante y/o dichas células modificadas por ingeniería genética. En algunas divulgaciones, los métodos implican comparar, individualmente, el nivel, cantidad o concentración del analito en la muestra con un nivel umbral, determinando de este modo un riesgo de desarrollar una toxicidad después de la administración de la terapia celular. En algunas divulgaciones, las comparaciones pueden usarse para determinar el riesgo de desarrollo de una toxicidad, después de la administración de una terapia celular.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos implican someter a ensayo una muestra biológica para determinar el nivel, cantidad o concentración de TNF-alfa, en donde la muestra biológica es de un sujeto que es candidato para el tratamiento, opcionalmente con una terapia celular, comprendiendo dicha terapia celular una dosis de células modificadas por ingeniería genética que comprenden linfocitos T que expresan un CAR para tratar una enfermedad o afección, en donde la muestra biológica se obtiene del sujeto antes de administrar la terapia celular y/o dicha muestra biológica no comprende el CAR y/o dichas células modificadas por ingeniería genética; y comparar el nivel, cantidad o concentración de TNF-alfa con un nivel umbral, en donde: (1) si el nivel, cantidad o concentración de TNF-alfa es exactamente o superior a un nivel umbral, identificar que el sujeto está en riesgo de desarrollar una neurotoxicidad de grado 3 o superior después de la administración de la terapia celular; y (2) si el nivel, cantidad o concentración de TNF-alfa es inferior al nivel umbral, identificar que el sujeto no está en riesgo de desarrollar una

neurotoxicidad de grado 3 o superior después de la administración de la terapia celular.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, si el sujeto se identifica como en riesgo de desarrollar una neurotoxicidad de grado 3 o superior, el método implica además: (i) administrar al sujeto la terapia celular, opcionalmente a una dosis reducida, opcionalmente en donde (a) el método comprende además administrar al sujeto un agente u otro tratamiento capaz de tratar, prevenir, retrasar, reducir o atenuar el desarrollo o riesgo de desarrollo de la neurotoxicidad; y/o (b) la administración de la terapia celular al sujeto se realiza o se especifica que se realiza en un entorno de hospitalización y/o con admisión en el hospital durante uno o más días; o (ii) administrar al sujeto un tratamiento alternativo distinto de la terapia celular para tratar la enfermedad o afección.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, si el sujeto se identifica como no en riesgo de desarrollar una neurotoxicidad de grado 3 o superior después de la administración de la terapia celular: (i) al sujeto no se le administra un agente u otro tratamiento capaz de tratar, prevenir, retrasar, reducir o atenuar el desarrollo o riesgo de desarrollo de una toxicidad a menos que o hasta que los sujetos presenten un signo o síntoma de una toxicidad, opcionalmente en el momento o después de que el sujeto presente una fiebre sostenida o una fiebre que es o no se ha reducido o no se reduce en más de 1 °C después del tratamiento con un antipirético; y/o (ii) la administración y cualquier seguimiento se realiza de forma ambulatoria y/o sin admitir al sujeto en un hospital y/o sin pasar la noche en un hospital y/o sin requerir la admisión o una estancia de una noche en un hospital, opcionalmente a menos que o hasta que el sujeto presente una fiebre sostenida o una fiebre que se haya reducido o no se haya reducido o no se haya reducido en más de 1 °C después del tratamiento con un antipirético.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el método de ensayo implica: (a) poner en contacto una muestra biológica con uno o más reactivos capaces de detectar o que son específicos para TNF-alfa, opcionalmente en donde el uno o más reactivos comprenden un anticuerpo que reconoce específicamente TNF-alfa; y (b) detectar la presencia o ausencia de un complejo que comprende el uno o más reactivos y TNF-alfa.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el método implica administrar a un sujeto una terapia celular para tratar una enfermedad o afección, comprendiendo dicha terapia celular una dosis de células modificadas por ingeniería genética que comprenden linfocitos T que expresan un CAR, en donde: (1) si el sujeto tiene un nivel, cantidad o concentración de TNF-alfa en una muestra biológica del sujeto que es exactamente o superior a un nivel umbral, el sujeto se identifica como en riesgo de desarrollar neurotoxicidad de grado 3 o superior después de la administración de la terapia celular: (i) administrar al sujeto la terapia celular a una dosis reducida, (ii) administrar además al sujeto un agente u otro tratamiento capaz de tratar, prevenir, retrasar, reducir o atenuar el desarrollo o riesgo de desarrollo de una toxicidad; y/o (iii) la administración de la terapia celular al sujeto se realiza o se especifica que se realiza en un entorno de hospitalización y/o con admisión en el hospital durante uno o más días; o (2) si el sujeto se selecciona o se identifica como que tiene un nivel, cantidad o concentración de TNF-alfa en una muestra biológica del sujeto que es inferior a un nivel umbral, el sujeto se identifica como no en riesgo de desarrollar neurotoxicidad de grado 3 o superior después de la administración de la terapia celular: (ii) no administrar al sujeto un agente u otro tratamiento capaz de tratar, prevenir, retrasar, reducir o atenuar el desarrollo o riesgo de desarrollo de una toxicidad a menos que o hasta que los sujetos presenten un signo o síntoma de una toxicidad, opcionalmente en el momento o después de que el sujeto presente una fiebre sostenida o una fiebre que es o no se ha reducido o no se reduce en más de 1 °C después del tratamiento con un antipirético; y/o (ii) la administración, y cualquier seguimiento, se realiza de forma ambulatoria y/o sin admitir al sujeto en un hospital y/o sin pasar la noche en un hospital y/o sin requerir la admisión o una estancia de una noche en un hospital, opcionalmente a menos que o hasta que el sujeto presente una fiebre sostenida o una fiebre que se haya reducido o no se haya reducido o no se haya reducido en más de 1 °C después del tratamiento con un antipirético, en donde el sujeto es un candidato para el tratamiento con la terapia celular, dicha muestra biológica obtenida del sujeto antes de administrar la terapia celular y/o dicha muestra biológica no comprende el CAR y/o dichas células modificadas por ingeniería genética.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, si el sujeto se identifica como en riesgo de desarrollar neurotoxicidad de grado 3 o superior después de la administración de la terapia celular, el método implica administrar el agente u otro tratamiento capaz de tratar, prevenir, retrasar, reducir o atenuar el desarrollo o riesgo de desarrollo de una toxicidad, en donde el agente se administra al sujeto simultáneamente con la terapia celular o en los tres días posteriores a la administración de la terapia celular al sujeto.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el método incluye (a) someter a ensayo una muestra biológica de un sujeto para determinar el nivel, cantidad o concentración de IL-16, habiendo recibido dicho sujeto la administración de una terapia celular que comprende una dosis de células modificadas por ingeniería genética que comprenden linfocitos T que expresan un CAR para tratar una enfermedad o afección, en donde la muestra biológica se obtiene del sujeto uno, dos o tres días después del inicio de la administración de la terapia celular; y (b) comparar el nivel, cantidad o concentración de IL-16 con un nivel umbral, en donde: (1) si el nivel, cantidad o concentración de IL-16 es exactamente o superior a un nivel umbral, identificar que el sujeto está en riesgo de desarrollar una neurotoxicidad de grado 3 o superior; y (2) si el nivel, cantidad o concentración de IL-16 es inferior al nivel umbral, identificar que el sujeto no está en riesgo de desarrollar una neurotoxicidad de grado 3 o superior.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, si el sujeto se identifica en riesgo de desarrollar una

neurotoxicidad de grado 3 o superior, el método implica administrar un agente u otro tratamiento capaz de tratar, prevenir, retrasar, reducir o atenuar el desarrollo o riesgo de desarrollo de una toxicidad. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el ensayo implica (a) poner en contacto una muestra biológica con uno o más reactivos capaces de detectar o que son específicos para IL-16, opcionalmente en donde el uno o más reactivos comprenden un anticuerpo que reconoce específicamente IL-16; y (b) detectar la presencia o ausencia de un complejo que comprende el uno o más reactivos y IL-16. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el método implica antes del ensayo, administrar al sujeto la terapia celular.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el método implica administrar a un sujeto, identificado como en riesgo de desarrollar una neurotoxicidad de grado 3 o superior, un agente u otro tratamiento capaz de tratar, prevenir, retrasar, reducir o atenuar el desarrollo o riesgo de desarrollo de una toxicidad, habiendo recibido anteriormente dicho sujeto la administración de una terapia celular para tratar una enfermedad o afección, en donde, en el momento o inmediatamente antes de administrar el agente, el sujeto se selecciona o se identifica como en riesgo de desarrollar una neurotoxicidad de grado 3 o superior si el nivel o cantidad o concentración de IL-16 en una muestra biológica, obtenida del sujeto en uno, dos o tres días del inicio de la administración de la terapia celular, es superior a un nivel umbral. En algunas realizaciones, la administración del agente se realiza en un momento en el que el sujeto presenta una fiebre sostenida o una fiebre que es o no se ha reducido o no se reduce en más de 1 °C después del tratamiento con un antipirético. En algunas realizaciones, la administración al sujeto de la terapia celular se realizó de forma ambulatoria y, si el nivel, cantidad o concentración de IL-16 es superior a un nivel umbral, el método comprende admitir al paciente en el hospital durante uno o más días.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la muestra biológica es o se obtiene de una muestra de sangre, plasma o suero. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el ensayo comprende un inmunoensayo. En algunos casos, en el presente documento se divulga una terapia celular para su uso en un método de tratamiento, en donde el método comprende: someter a ensayo una muestra biológica para determinar el nivel, cantidad o concentración de TNF-alfa, en donde la muestra biológica es de un sujeto que es candidato para el tratamiento, opcionalmente con una terapia celular, comprendiendo dicha terapia celular una dosis de células modificadas por ingeniería genética que comprenden linfocitos T que expresan un CAR para tratar una enfermedad o afección, en donde la muestra biológica se obtiene del sujeto antes de administrar la terapia celular y/o dicha muestra biológica no comprende el CAR y/o dichas células modificadas por ingeniería genética; comparar el nivel, cantidad o concentración de TNF-alfa con un nivel umbral, en donde: (1) si el nivel, cantidad o concentración de TNF-alfa es exactamente o superior a un nivel umbral, identificar que el sujeto está en riesgo de desarrollar una neurotoxicidad de grado 3 o superior después de la administración de la terapia celular; y (2) si el nivel, cantidad o concentración de TNF-alfa es inferior al nivel umbral, identificar que el sujeto no está en riesgo de desarrollar una neurotoxicidad de grado 3 o superior después de la administración de la terapia celular; y administrar al sujeto la terapia celular, opcionalmente a una dosis reducida, opcionalmente en donde (a) el método comprende además administrar al sujeto un agente u otro tratamiento capaz de tratar, prevenir, retrasar, reducir o atenuar el desarrollo o riesgo de desarrollo de la neurotoxicidad; y/o (b) la administración al sujeto de la terapia celular se realiza o se especifica que se realiza en un entorno de hospitalización y/o con admisión en el hospital durante uno o más días.

En algunos de los casos que se divulgan en el presente documento, hay un agente u otro tratamiento capaz de tratar, prevenir, retrasar, reducir o atenuar el desarrollo o riesgo de desarrollo de una neurotoxicidad para su uso en un método de reducción de la neurotoxicidad después de la administración de una terapia celular, en donde el método comprende: someter a ensayo una muestra biológica para determinar el nivel, cantidad o concentración de TNF-alfa, en donde la muestra biológica es de un sujeto que es candidato para el tratamiento, opcionalmente con una terapia celular, comprendiendo dicha terapia celular una dosis de células modificadas por ingeniería genética que comprenden linfocitos T que expresan un CAR para tratar una enfermedad o afección, en donde la muestra biológica se obtiene del sujeto antes de administrar la terapia celular y/o dicha muestra biológica no comprende el CAR y/o dichas células modificadas por ingeniería genética; comparar el nivel, cantidad o concentración de TNF-alfa con un nivel umbral, en donde: (1) si el nivel, cantidad o concentración de TNF-alfa es exactamente o superior a un nivel umbral, identificar que el sujeto está en riesgo de desarrollar una neurotoxicidad de grado 3 o superior después de la administración de la terapia celular; y (2) si el nivel, cantidad o concentración de TNF-alfa es inferior al nivel umbral, identificar que el sujeto no está en riesgo de desarrollar una neurotoxicidad de grado 3 o superior después de la administración de la terapia celular; y administrar al sujeto el agente u otro tratamiento y terapia celular, opcionalmente a una dosis reducida y/o (b) la administración al sujeto de la terapia celular se realiza o se especifica que se realiza en un entorno de hospitalización y/o con admisión en el hospital durante uno o más días.

En algunos casos, en el presente documento se divulga una terapia celular para su uso en un método de tratamiento, en donde el método comprende administrar a un sujeto la terapia celular, opcionalmente a una dosis reducida, opcionalmente en donde (a) el método comprende además administrar al sujeto un agente u otro tratamiento capaz de tratar, prevenir, retrasar, reducir o atenuar el desarrollo o riesgo de desarrollo de la neurotoxicidad; y/o (b) la administración al sujeto de la terapia celular se realiza o se especifica que se realiza en un entorno de hospitalización y/o con admisión en el hospital durante uno o más días, en donde dicho paciente se ha identificado como en riesgo de desarrollar una neurotoxicidad de grado 3 o superior después de la administración de la terapia celular basándose en un método que comprende: someter a ensayo una muestra biológica del sujeto que es un candidato para el tratamiento con una terapia celular, comprendiendo dicha terapia celular una dosis de células modificadas por

ingeniería genética que comprenden linfocitos T que expresan un CAR para tratar una enfermedad o afección, en donde la muestra biológica se obtiene del sujeto antes de administrar la terapia celular y/o dicha muestra biológica no comprende el CAR y/o dichas células modificadas por ingeniería genética para determinar el nivel, cantidad o concentración de TNF-alfa, y comparar el nivel, cantidad o concentración de TNF-alfa con un nivel umbral, en donde:

(1) si el nivel, cantidad o concentración de TNF-alfa es exactamente o superior a un nivel umbral, identificar que el sujeto está en riesgo de desarrollar una neurotoxicidad de grado 3 o superior después de la administración de la terapia celular; y (2) si el nivel, cantidad o concentración de TNF-alfa es inferior al nivel umbral, identificar que el sujeto no está en riesgo de desarrollar una neurotoxicidad de grado 3 o superior después de la administración de la terapia celular.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, hay un agente u otro tratamiento capaz de tratar, prevenir, retrasar, reducir o atenuar el desarrollo o riesgo de desarrollo de una neurotoxicidad para su uso en un método de reducción de la neurotoxicidad después de la administración de una terapia celular, en donde el método comprende: administrar a un sujeto la terapia celular, opcionalmente a una dosis reducida, y el agente u otro tratamiento, opcionalmente en donde la administración al sujeto de la terapia celular y el agente u otro tratamiento se realiza o se especifica que se realiza en un entorno de hospitalización y/o con admisión en el hospital durante uno o más días, en donde dicho paciente se ha identificado como en riesgo de desarrollar una neurotoxicidad de grado 3 o superior después de la administración de la terapia celular basándose en un método que comprende: someter a ensayo una muestra biológica del sujeto que es un candidato para el tratamiento con una terapia celular, comprendiendo dicha terapia celular una dosis de células modificadas por ingeniería genética que comprenden linfocitos T que expresan un CAR para tratar una enfermedad o afección, en donde la muestra biológica se obtiene del sujeto antes de administrar la terapia celular y/o dicha muestra biológica no comprende el CAR y/o dichas células modificadas por ingeniería genética para determinar el nivel, cantidad o concentración de TNF-alfa, y comparar el nivel, cantidad o concentración de TNF-alfa con un nivel umbral, en donde: (1) si el nivel, cantidad o concentración de TNF-alfa es exactamente o superior a un nivel umbral, identificar que el sujeto está en riesgo de desarrollar una neurotoxicidad de grado 3 o superior después de la administración de la terapia celular; y (2) si el nivel, cantidad o concentración de TNF-alfa es inferior al nivel umbral, identificar que el sujeto no está en riesgo de desarrollar una neurotoxicidad de grado 3 o superior después de la administración de la terapia celular.

II. INTERVENCIONES O AGENTES QUE TRATAN O MEJORAN LOS SÍNTOMAS DE TOXICIDAD

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos y artículos de fabricación que se divulgan pueden usarse en relación con, o implican o incluyen, uno o más agentes o tratamientos para tratar, prevenir, retrasar o atenuar el desarrollo de una toxicidad. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente u otro tratamiento capaz de tratar, prevenir, retrasar o atenuar el desarrollo de una toxicidad se administra antes y/o simultáneamente con la administración de una composición celular terapéutica que comprende las células modificadas genéticamente.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente, por ejemplo, un agente dirigido a la toxicidad, o el tratamiento capaz de tratar, prevenir, retrasar o atenuar el desarrollo de una toxicidad es un esteroide, es un antagonista o inhibidor de un receptor de citocinas, tal como un receptor de IL-6, un receptor de CD 122 (receptor de IL-2Rbeta) o CCR2, o es un inhibidor de una citocina, tal como IL-6, MCP-1, IL-10, IFN- γ , IL-8 o IL-18. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es un agonista de un receptor de citocinas y/o citocinas, tal como TGF- β . En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente, por ejemplo, agonista, antagonista o inhibidor, es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, una molécula pequeña, una proteína o péptido, a un ácido nucleico.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, puede emplearse un bolo de fluido como intervención, tal como para tratar la hipotensión asociada a CRS. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los niveles de hematocrito objetivo son > 24 %. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la intervención incluye el uso de tecnología de resina absorbente con filtración de sangre o plasma. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la intervención incluye diálisis, plasmaféresis o tecnologías similares. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, pueden emplearse vasopresores o acetaminofeno.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente puede administrarse secuencialmente, intermitentemente o al mismo tiempo que o en la misma composición que la terapia, tal como células para terapia celular adoptiva. Por ejemplo, el agente puede administrarse antes, durante, simultáneamente con, o después de la administración de la inmunoterapia y/o terapia celular.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente se administra en un momento como se describe en el presente documento y de acuerdo con los métodos que se divulgan y/o con los artículos de fabricación o composiciones que se divulgan. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente dirigido a la toxicidad se administra en un momento en, tal como inferior a o no superior a, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días después del inicio de la inmunoterapia y/o terapia celular. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente dirigido a la toxicidad se administra en o en aproximadamente 1 día, 2 días o 3 días después del inicio de la administración de la inmunoterapia y/o terapia celular.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente, por ejemplo, agente dirigido a la toxicidad, se administra a un sujeto después del inicio de la administración de la inmunoterapia y/o terapia celular en un momento en el que el sujeto no presenta CRS de grado 2 o superior o neurotoxicidad de grado 2 o superior. En algunas divulgaciones, el agente dirigido a la toxicidad se administra después del inicio de la administración de la inmunoterapia y/o terapia celular en un momento en el que el sujeto no presenta CRS grave o neurotoxicidad grave. Por lo tanto, entre el inicio de la administración de la inmunoterapia y/o terapia celular y el agente dirigido a la toxicidad, el sujeto es uno que no presenta CRS de grado 2 o superior, tal como CRS grave, y/o no presenta neurotoxicidad de grado 2 o superior, tal como neurotoxicidad grave.

Se describen ejemplos no limitantes de intervenciones para tratar o mejorar una toxicidad, tal como CRS grave (sCRS) o neurotoxicidad grave, en la **Tabla 5**. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la intervención incluye tocilizumab u otro agente dirigido a la toxicidad como se describe, que puede ser en un momento en el que hay una fiebre sostenida o persistente de más de o aproximadamente 38 °C o más de o más de aproximadamente 39 °C en el sujeto. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la fiebre se sostiene en el sujeto durante más de 10 horas, más de 12 horas, más de 16 horas o más de 24 horas antes de la intervención.

Tabla 5. Intervenciones de ejemplo.	
Síntomas relacionados con la CRS	Intervención sugerida
Fiebre de $\geq 38,3$ °C	Acetaminofeno (12,5 mg/kg) VO/IV hasta cada cuatro horas
Fiebre persistente de ≥ 39 °C durante 10 horas que no responde al acetaminofeno	Tocilizumab (8-12 mg/kg) IV
Fiebre persistente de ≥ 39 °C después de tocilizumab	Dexametasona 5-10 mg IV/VO hasta cada 6-12 horas con fiebre continua
Recurrencia de los síntomas 48 horas después de la dosis inicial de tocilizumab	Tocilizumab (8-12 mg/kg) IV
Hipotensión	Bolo de fluido, hematocrito objetivo > 24 %
Hipotensión persistente/recurrente después del bolo de fluido inicial (en 6 horas)	Tocilizumab (8-12 mg/kg) IV
Uso de vasopresores de dosis baja para la hipotensión durante más de 12 horas	Dexametasona 5-10 mg IV/VO hasta cada 6 horas con el uso continuado de vasopresores
Inicio de vasopresores de dosis más altas o adición de un segundo vasopresor para la hipotensión	Dexametasona 5-10 mg IV/VO hasta cada 6 horas con el uso continuado de vasopresores
Inicio de la suplementación de oxígeno	Tocilizumab (8-12 mg/kg) IV
Aumento del soporte respiratorio con preocupación por intubación inminente	Dexametasona 5-10 mg IV/VO hasta cada 6 horas con el uso continuado de vasopresores
Recurrencia/persistencia de síntomas para los que se proporcionó tocilizumab ≥ 48 horas después de la administración de la dosis inicial	Tocilizumab (8-12 mg/kg) IV

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente o terapia o intervención, por ejemplo, agente dirigido a la toxicidad, se administra solo o se administra como parte de una composición o formulación, tal como una composición o formulación farmacéutica, como se describe en el presente documento. Por lo tanto, el agente solo o como parte de una composición farmacéutica puede administrarse por vía intravenosa o por vía oral, o por cualquier otra vía de administración conocida aceptable o como se describe en el presente documento.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosificación del agente o la frecuencia de administración del agente en una pauta posológica se reduce en comparación con la dosificación del agente o su frecuencia en un método en el que un sujeto se trata con el agente después de CRS o neurotoxicidad de grado 2 o superior, tal como después de CRS grave, por ejemplo, de grado 3 o superior, o después de neurotoxicidad grave, por ejemplo, de grado 3 o superior, se ha desarrollado o se ha diagnosticado (por ejemplo, después de que se hayan manifestado signos o síntomas físicos de CRS o neurotoxicidad de grado 3 o superior). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosificación del agente o la frecuencia de administración del agente en una pauta posológica se reduce en comparación con la dosificación del agente o su frecuencia en un método en el que un sujeto se trata para CRS o neurotoxicidad durante más de 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, tres semanas o más después de la administración de la inmunoterapia y/o terapia celular. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosificación se reduce en más de o más de aproximadamente 1,2 veces, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces o más. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosificación se reduce en más de o aproximadamente el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, se reduce la frecuencia de dosificación, tal como se reduce el número de dosis diarias o se reduce el número de días de

dosificación.

A. Esteroide

- 5 En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente, por ejemplo, agente dirigido a la toxicidad, que trata y/o que previene, retrasa o atenúa el desarrollo o el riesgo de desarrollar una toxicidad a una inmunoterapia y/o una terapia celular, es un esteroide, por ejemplo, corticoesteroide. Los corticoesteroides normalmente incluyen glucocorticoides y mineralocorticoides.
- 10 Puede usarse cualquier corticoesteroide, por ejemplo, glucocorticoide, en los métodos que se divulgan en el presente documento. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los glucocorticoides incluyen glucocorticoides sintéticos y no sintéticos. Los glucocorticoides de ejemplo incluyen, pero sin limitación: alclometasonas, algestonas, beclometasonas (por ejemplo, dipropionato de beclometasona), betametasonas (por ejemplo, 17-valerato de betametasona, acetato sódico de betametasona, fosfato sódico de betametasona, valerato de betametasona), budesonidas, clobetasoles (por ejemplo, propionato de clobetasol), clobetasonas, clocortolonas (por ejemplo, pivalato de clocortolona), cloprednol, corticoesteronas, cortisonas e hidrocortisonas (por ejemplo, acetato de hidrocortisona), cortivazoles, deflazacorts, desonidas, desoximetasonas, dexametasonas (por ejemplo, 21-fosfato de dexametasona, acetato de dexametasona, fosfato sódico de dexametasona), diflorasonas (por ejemplo, diacetato de diflorasona), diflucortolonas, difluprednatos, enoxolonas, fluazacorts, fluclozonidas, fludrocortisonas (por ejemplo, acetato de fludrocortisona), flumetasonas (por ejemplo, pivalato de flumetasona), flunisolidas, fluocinolonas (por ejemplo, acetónido de fluocinolona), fluocinonidas, fluocortinas, flucortolonas, fluorometolonas (por ejemplo, acetato de fluorometolona), fluperolonas (por ejemplo, acetato de fluperolona), fluprednidenos, fluprednisolonas, flurandrenolidas, fluticasonas (por ejemplo, propionato de fluticasona), formocortales, halcinonidas, halobetasoles, halometasonas, halopredonas, hidrocortamatos, hidrocortisonas (por ejemplo, 21-butilato de hidrocortisona, aceponato de hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, buteprato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, cipionato de hidrocortisona, hemisuccinato de hidrocortisona, probutato de hidrocortisona, fosfato sódico de hidrocortisona, succinato sódico de hidrocortisona, valerato de hidrocortisona), etabonato de loteprednol, mazipredonas, medrisonas, meprednisonas, metilprednisolonas (aceponato de metilprednisolona, acetato de metilprednisolona, hemisuccinato de metilprednisolona, succinato sódico de metilprednisolona), mometasonas (por ejemplo, furoato de mometasona), parametasonas (por ejemplo, acetato de parametasona), prednicarbatos, prednisolonas (por ejemplo, 25-dietilaminoacetato de prednisolona, fosfato sódico de prednisolona, 21-hemisuccinato de prednisolona, acetato de prednisolona; famesilato de prednisolona, hemisuccinato de prednisolona, prednisolona-21 (beta-D-glucurónido), metasulfobenzoato de prednisolona, esteagato de prednisolona, tebutato de prednisolona, tetrahidroftalato de prednisolona), prednisonas, prednivalas, prednilidenos, rimexolonas, tixocortoles, triamcinolonas (por ejemplo, acetónido de triamcinolona, benetónido de triamcinolona, hexacetónido de triamcinolona, 21-palmitato de acetónido de triamcinolona, diacetato de triamcinolona). Estos glucocorticoides y las sales de los mismos se analizan en detalle, por ejemplo, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, A. Osol, ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (16.^a ed. 1980).
- 40 En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el glucocorticoide se selecciona de entre cortisonas, dexametasonas, hidrocortisonas, metilprednisolonas, prednisolonas y prednisonas. En un ejemplo particular, el glucocorticoide es dexametasona.
- 45 En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es un corticoesteroide y se administra en una cantidad que es terapéuticamente eficaz para tratar, mejorar o reducir uno o más síntomas de una toxicidad a una inmunoterapia y/o una terapia celular, tal como CRS o neurotoxicidad. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los indicadores de mejora o tratamiento exitoso incluyen la determinación del fracaso para manifestar una puntuación relevante en la escala de calificación de toxicidad (por ejemplo, escala de calificación de CRS o neurotoxicidad), tal como una puntuación de menos de 3, o un cambio en la calificación o gravedad en la escala de calificación como se analiza en el presente documento, tal como un cambio de una puntuación de 4 a una puntuación de 3, o un cambio de una puntuación de 4 a una puntuación de 2, 1 o 0.
- 50 En algunas divulgaciones, el corticoesteroide se proporciona en una dosis terapéuticamente eficaz. La concentración terapéuticamente eficaz puede determinarse empíricamente mediante ensayos en sistemas conocidos *in vitro* o *in vivo* (por ejemplo, modelo en animal). Por ejemplo, la cantidad de un corticoesteroide seleccionado que ha de administrarse para mejorar los síntomas o efectos adversos de una toxicidad a una inmunoterapia y/o una terapia celular, tal como CRS o neurotoxicidad, puede determinarse mediante técnicas clínicas convencionales. Además, pueden emplearse modelos en animales para ayudar a identificar los intervalos óptimos de dosificación. La dosificación precisa, que puede determinarse empíricamente, puede depender de la preparación terapéutica particular, la pauta y el esquema de dosificación, la vía de administración y la gravedad de la enfermedad.
- 60 El corticoesteroide puede administrarse en cualquier cantidad que sea eficaz para mejorar uno o más síntomas asociados a la toxicidad, tal como con la CRS o neurotoxicidad. El corticoesteroide, por ejemplo, glucocorticoide, puede administrarse, por ejemplo, en una cantidad de entre exactamente o aproximadamente 0,1 y 100 mg, por dosis, de 0,1 a 80 mg, de 0,1 a 60 mg, de 0,1 a 40 mg, de 0,1 a 30 mg, de 0,1 a 20 mg, de 0,1 a 15 mg, de 0,1 a 10 mg, de 0,1 a 5 mg, de 0,2 a 40 mg, de 0,2 a 30 mg, de 0,2 a 20 mg, de 0,2 a 15 mg, de 0,2 a 10 mg, de 0,2 a 5 mg, de 0,4 a 40 mg,
- 65

de 0,4 a 30 mg, de 0,4 a 20 mg, de 0,4 a 15 mg, de 0,4 a 10 mg, de 0,4 a 5 mg, de 0,4 a 4 mg, de 1 a 20 mg, de 1 a 15 mg o 1 a 10 mg, a un sujeto humano adulto de 70 kg. Normalmente, el corticoesteroide, tal como un glucocorticoide, se administra en una cantidad de entre exactamente o aproximadamente 0,4 y 20 mg, por ejemplo, exactamente o aproximadamente 0,4 mg, 0,5 mg, 0,6 mg, 0,7 mg, 0,75 mg, 0,8 mg, 0,9 mg, 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg, 10 mg, 11 mg, 12 mg, 13 mg, 14 mg, 15 mg, 16 mg, 17 mg, 18 mg, 19 mg o 20 mg por dosis, a un sujeto humano adulto promedio.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el corticoesteroide puede administrarse, por ejemplo, a una dosificación de exactamente o aproximadamente 0,001 mg/kg (del sujeto), 0,002 mg/kg, 0,003 mg/kg, 0,004 mg/kg, 0,005 mg/kg, 0,006 mg/kg, 0,007 mg/kg, 0,008 mg/kg, 0,009 mg/kg, 0,01 mg/kg, 0,015 mg/kg, 0,02 mg/kg, 0,025 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,035 mg/kg, 0,04 mg/kg, 0,045 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,055 mg/kg, 0,06 mg/kg, 0,065 mg/kg, 0,07 mg/kg, 0,075 mg/kg, 0,08 mg/kg, 0,085 mg/kg, 0,09 mg/kg, 0,095 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,15 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,30 mg/kg, 0,35 mg/kg, 0,40 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,50 mg/kg, 0,55 mg/kg, 0,60 mg/kg, 0,65 mg/kg, 0,70 mg/kg, 0,75 mg/kg, 0,80 mg/kg, 0,85 mg/kg, 0,90 mg/kg, 0,95 mg/kg, 1 mg/kg, 1,05 mg/kg, 1,1 mg/kg, 1,15 mg/kg, 1,20 mg/kg, 1,25 mg/kg, 1,3 mg/kg, 1,35 mg/kg o 1,4 mg/kg, a un sujeto humano adulto promedio, normalmente que pesa de aproximadamente 70 kg a 75 kg.

El corticoesteroide, o glucocorticoide, por ejemplo, dexametasona, puede administrarse por vía oral (comprimidos, líquido o concentrado líquido), VO, por vía intravenosa (IV), por vía intramuscular o por cualquier otra vía conocida o vía que se describe en el presente documento (por ejemplo, con respecto a formulaciones farmacéuticas). En algunas divulgaciones, el corticoesteroide se administra en forma de un bolo y, en otras divulgaciones, puede administrarse durante un período de tiempo.

En algunas divulgaciones, el glucocorticoide puede administrarse durante un período de más de un día, tal como durante dos días, durante 3 días o durante 4 o más días. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el corticoesteroide puede administrarse una vez al día, dos veces al día, o tres veces o más al día. Por ejemplo, el corticoesteroide, por ejemplo, dexametasona, en algunos casos que se divulgan en el presente documento puede administrarse a 10 mg (o equivalente) IV dos veces al día durante tres días.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosificación de corticoesteroide, por ejemplo, glucocorticoide, se administra en dosis sucesivamente más bajas por tratamiento. Por lo tanto, en algunos de dichas pautas de tratamiento, la dosis de corticoesteroide se reduce gradualmente. Por ejemplo, el corticoesteroide puede administrarse a una dosis inicial (o dosis equivalente, tal como con referencia a la dexametasona) de 4 mg, y tras cada administración sucesiva la dosis puede reducirse, de manera que la dosis sea de 3 mg para la siguiente administración, 2 mg para la siguiente administración y 1 mg para la siguiente administración.

En general, la dosis de corticoesteroide administrada depende del corticoesteroide específico, ya que existe una diferencia en la potencia entre diferentes corticoesteroides. Por lo general, se entiende que los fármacos varían en potencia y que, por lo tanto, las dosis pueden variar, con el fin de obtener efectos equivalentes. La **Tabla 6** muestra la equivalencia en términos de potencia para diversos glucocorticoides y vías de administración. La potencia equivalente en la dosificación clínica es bien conocida. Puede encontrarse información relacionada con la dosificación de esteroides equivalente (de una manera no cronoterapéutica) en el Formulario Nacional Británico (BNF, por sus siglas en inglés) 37, Marzo de 1999.

Tabla 6: Administración de glucocorticoides	
Glucocorticoide (Vía)	Potencia de equivalencia
Hidrocortisona (IV o VO)	20
Prednisona	5
Prednisolona (IV o VO)	5
Succinato sódico de metilprednisolona (IV)	4
Dexametasona (IV o VO)	0,5-0,75

Por lo tanto, en algunos casos que se divulgan en el presente documento, el esteroide se administra en una cantidad de dosificación equivalente de desde o de aproximadamente 1,0 mg a 20 mg de dexametasona por día, tal como de 1,0 mg a 15 mg de dexametasona por día, de 1,0 mg a 10 mg de dexametasona por día, de 2,0 mg a 8 mg de dexametasona por día o de 2,0 mg a 6,0 mg de dexametasona por día, cada uno inclusive. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el esteroide se administra en una dosis equivalente de aproximadamente 4 mg o aproximadamente 8 mg de dexametasona por día.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el esteroide se administra si la fiebre persiste después del tratamiento con tocilizumab. Por ejemplo, en algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dexametasona se administra por vía oral o por vía intravenosa a una dosis de 5-10 mg hasta cada 6-12 horas con fiebre continua. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el tocilizumab se administra simultáneamente con o después de la suplementación con oxígeno.

B. Inhibidor de células microgliales

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el inhibidor en la terapia de combinación es un inhibidor de la actividad de una célula microglial. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la administración del inhibidor modula la actividad de la microglía. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el inhibidor es un antagonista que inhibe la actividad de una vía de señalización en la microglía. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el inhibidor de microglía afecta a la homeostasis, supervivencia y/o proliferación microgliales. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el inhibidor se dirige a la vía de señalización de CSF1R. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el inhibidor es un inhibidor de CSF1R. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el inhibidor es una molécula pequeña. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el inhibidor es un anticuerpo.

En algunas divulgaciones, la administración del inhibidor da como resultado uno o más efectos seleccionados de una alteración en la homeostasis y la viabilidad microgliales, una disminución o bloqueo de la proliferación de las células microgliales, una reducción o eliminación de las células microgliales, una reducción de la activación microglial, una reducción de la producción de óxido nítrico a partir de la microglía, una reducción de la actividad de la óxido nítrico sintasa en la microglía, o la protección de las neuronas motoras afectadas por la activación microglial. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente altera el nivel de un biomarcador sérico o sanguíneo de la inhibición de CSF1R, o una disminución en el nivel de N-telopéptido (NTX) reticulado de tipo 1 de colágeno urinario en comparación con un momento justo antes del inicio de la administración del inhibidor. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la administración del agente inhibe transitoriamente la actividad de la microglía y/o en donde la inhibición de la actividad de la microglía no es permanente. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la administración del agente inhibe transitoriamente la actividad de CSF1R y/o en donde la inhibición de la actividad de CSF1R no es permanente.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente que reduce la actividad de las células microgliales es una molécula pequeña, péptido, proteína, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, un mimético de anticuerpo, un aptámero o una molécula de ácido nucleico. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el método implica la administración de un inhibidor de la actividad de la microglía. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es un antagonista que inhibe la actividad de una vía de señalización en la microglía. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente que reduce la actividad de las células microgliales afecta a la homeostasis, supervivencia y/o proliferación microgliales.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente que reduce la activación de las células microgliales se selecciona de un agente antiinflamatorio, un inhibidor de la NADPH oxidasa (NOX2), un bloqueante de los canales de calcio, un bloqueante de los canales de sodio, inhibe GM-CSF, inhibe CSF1R, se une específicamente a CSF-1, se une específicamente a IL-34, inhibe la activación del factor nuclear kappa B (NF-κB), activa un receptor de CB₂ y/o es un agonista de CB₂, un inhibidor de fosfodiesterasa, inhibe microARN-155 (miR-155), regula positivamente microARN-124 (miR-124), inhibe la producción de óxido nítrico en la microglía, inhibe la óxido nítrico sintasa o activa el factor de transcripción NRF2 (también denominado factor nuclear (derivado de eritroide 2) similar a 2, o NFE2L2).

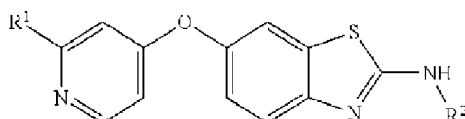
En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente que reduce la actividad de las células microgliales se dirige a CSF1 (también denominado factor estimulante de colonias de macrófagos MCSF). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente que reduce la actividad de las células microgliales afecta a la fosforilación estimulada por MCSF del receptor de M-CSF (Pryer *et al.* *Proc Am Assoc Cancer Res*, Resumen de AACR N.º DDT02-2 (2009)). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente que reduce la actividad de las células microgliales es MCS110 (Publicación de Solicitud de Patente Internacional número WO2014001802; N.º de registro de estudio de ensayo clínico: A1 NCT00757757; NCT02807844; NCT02435680; NCT01643850).

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente que reduce la actividad de las células microgliales es una molécula pequeña que se dirige a la vía de CSF1. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es una molécula pequeña que se une a CSF1R. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es una molécula pequeña que inhibe la actividad de la cinasa CSF1R compitiendo con la unión de ATP a la cinasa CSF1R. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es una molécula pequeña que inhibe la activación del receptor de CSF1R. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la unión del ligando de CSF-1 al CSF1R se inhibe. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente que reduce la actividad de las células microgliales es cualquiera de los inhibidores que se describen en el Número de Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. US20160032248.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es un inhibidor de molécula pequeña seleccionado de PLX-3397, PLX7486, JNJ-40346527, JNJ28312141, ARRY-382, PLX73086 (AC-708), DCC-3014, AZD6495, GW2580, Ki20227, BLZ945, PLX647, PLX5622. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es cualquiera de los inhibidores que se describen en Conway *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(44):16078-83 (2005); Dagher *et al.*, *Journal of Neuroinflammation*, 12:139 (2015); Ohno *et al.*, *Mol Cancer Ther*.

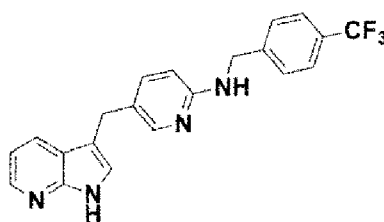
5(11):2634-43 (2006); von Tresckow *et al.* *Clin Cancer Res.*, 21(8) (2015); Manthey *et al.* *Mol Cancer Ther.* (8(11):3151-61 (2009); Pyonteck *et al.*, *Nat Med.* 19(10): 1264-1272 (2013); Haegel *et al.*, Resumen de *Cancer Res AACR* N.º 288 (2015); Smith *et al.*, Resumen de *Cancer Res AACR* N.º 4889 (2016); N.º de registro de estudio de ensayo clínico: NCT01525602; NCT02734433; NCT02777710; NCT01804530; NCT01597739; NCT01572519; NCT01054014; NCT01316822; NCT02880371; NCT02673736; las Publicaciones de Solicitud de Patente Internacional números WO2008063888A2, WO2006009755A2, Números de publicación de solicitud de patente de los EE.UU. US20110044998, US 2014/0065141 y US 2015/0119267.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente que reduce la actividad de las células microgliales es 4-((2-(((1R,2R)-2-hidrox ciclohexil)amino)benzo[d]tiazol-6-il)oxi)-N-metilpicolinamida (BLZ945) o una sal aceptable de la misma o derivados de la misma. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es el siguiente compuesto:

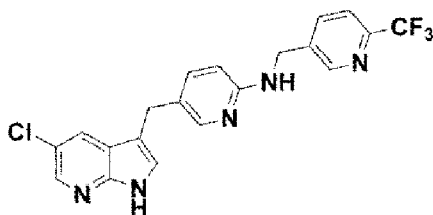


en donde R1 es un alquil pirazol o una alquil carboxamida, y R2 es un hidrox cicloalquilo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente que reduce la actividad de las células microgliales es 5-((5-cloro-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il)metil)-N-((6-(trifluorometil)piridin-3-il)metil)piridin-2-amina, N-[5-[(5-Cloro-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il)metil]-2-piridinil]-6-(trifluorometil)-3-piridinmetanamina) (PLX 3397) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma o derivados de la misma. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es diclorhidrato de 5-(1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-ilmetil)-N-[[4-(trifluorometil)fenil]metil]-2-piridinamina (PLX647) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma o derivados de la misma. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente que reduce la actividad de las células microgliales es el siguiente compuesto:

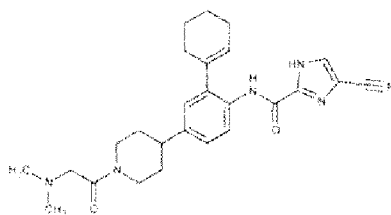


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente que reduce la actividad de las células microgliales es el siguiente compuesto:



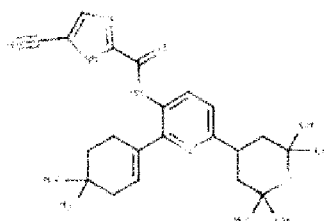
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es cualquiera de los inhibidores que se describen en la patente de los EE.UU. número US7893075.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente que reduce la actividad de las células microgliales es monoclóhidrato de 4-ciano-N-[2-(1-ciclohexen-1-il)-4-[1-[(dimetilamino)acetil]-4-piperidinil]fenil]-1H-imidazol-2-carboxamida (JNJ28312141) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o derivados del mismo. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es el siguiente compuesto:



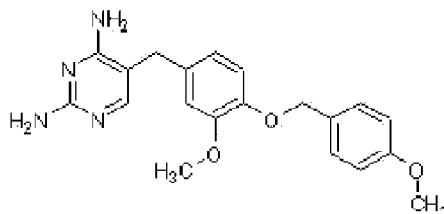
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es cualquiera de los inhibidores que se describen en la patente de los EE.UU. número US7645755.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente que reduce la actividad de las células microgliales es 1H-imidazol-2-carboxamida, 5-ciano-N-(2-(4,4-dimetil-1-ciclohexen-1-il)-6-(tetrahydro-2,2,6,6-tetrametil-2H-piran-4-il)-3-piridinil)-, Ácido 4-ciano-1H-imidazol-2-carboxílico N-(2-(4,4-dimetilciclohex-1-enil)-6-(2,2,6,6-tetrametiltetrahidropiran-4-il)piridin-3-il)amida, 4-Ciano-N-(2-(4,4-dimetilciclohex-1-en-1-il)-6-(2,2,6,6-tetrametil-tetrahydro-2H-piran-4-il)piridin-3-il)-1H-imidazol-2-carboxamida (JNJ-40346527) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma o derivados de la misma. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es el siguiente compuesto:



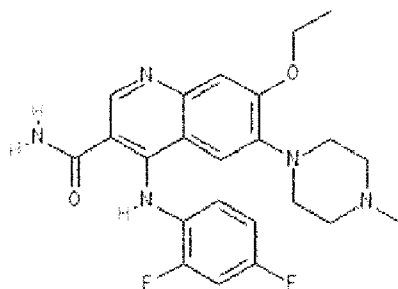
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otro caso que se divulga en el presente documento, el agente que reduce la actividad de las células microgliales es 5-(3-Metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)pirimidina-2,4-diamina (GW2580) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma o derivados de la misma. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es el siguiente compuesto:



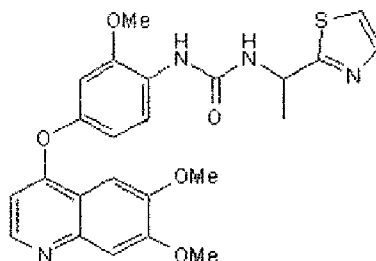
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (Publicación de Solicitud de Patente Internacional número WO2009099553).

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente que reduce la actividad de las células microgliales es 4-(2,4-difluoroanilino)-7-etoxi-6-(4-metilpiperazin-1-il)quinolina-3-carboxamida (AZD6495) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma o derivados de la misma. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es el siguiente compuesto:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente que reduce la actividad de las células microgliales es N-{4-[(6,7-dimetoxi-4-quinolil)oxi]-2-metoxifenil}-N0-[1-(1,3-tiazol-2-il)etil]urea (Ki20227) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma o derivados de la misma. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es el siguiente compuesto:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 10 En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente que reduce la activación de las células microgliales es un anticuerpo que se dirige a la vía de CSF1. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es un anticuerpo que se une a CSF1R. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el anticuerpo anti-CSF1R bloquea la dimerización de CSF1R. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el anticuerpo anti-CSF1R bloquea la interfaz de dimerización de CSF1R que está formada por los dominios D4 y D5 (Ries *et al. Cancer Cell* 25(6):846-59 (2014)). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente se selecciona de emactuzumab (RG7155; RO5509554), Cabiralizumab (FPA-008), LY-3022855 (IMC-CS4), AMG-820, TG-3003, MCS110, H27K15, 12-2D6, 2-4A5 (Rovida y Sbarba, *J Clin Cell Immunol.* 6:6 (2015); N.º de registro de estudio de ensayo clínico: NCT02760797; NCT01494688; NCT02323191; NCT01962337; NCT02471716; NCT02526017; NCT01346358; NCT02265536; NCT01444404; NCT02713529, NCT00757757; NCT02807844; NCT02435680; NCT01643850).

- En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente que reduce la activación de las células microgliales es un antibiótico de tetraciclina. Por ejemplo, el agente afecta a la concentración de IL-1b, IL-6, TNF- α o iNOS en células de la microglía (Yrjänheikki *et al. PNAS* 95(26): 15769-15774 (1998); N.º de registro de estudio de ensayo clínico: NCT01120899). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es un antagonista opioide (Younger *et al. Pain Med.* 10(4):663-672 (2009).) En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente reduce la neurotransmisión glutamatérgica (Número de patente de los EE.UU. 5.527.814). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente modula la señalización de NFkB (Valera *et al. J. Neuroinflammation* 12:93 (2015); N.º de registro de estudio de ensayo clínico: NCT00231140). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente se dirige a los receptores de cannabinoides (Ramírez *et al. J. Neurosci* 25(8):1904-13(2005)). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente se selecciona de minociclina, naloxona, riluzol, lenalidomida y un cannabinoide (opcionalmente WIN55 o 212-2).

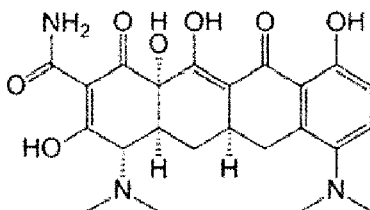
- Se cree que la producción de óxido nítrico a partir de la microglía, en algunos casos que se divulgan en el presente documento, da como resultado o aumenta la neurotoxicidad. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente modula o inhibe la producción de óxido nítrico a partir de la microglía. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente inhibe la óxido nítrico sintasa (NOS). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el inhibidor de NOS es la Ronopterina (VAS-203), también conocida como 4-amino-tetrahidrobiopterina (4-ABH4). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el inhibidor de NOS es cindunistat, A-84643, ONO-1714, L-NOARG, NCX-456, VAS-2381, GW-273629, NXN-462, CKD-712, KD-7040 o disulfuro de guanidinoetilo. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es cualquiera de los inhibidores que se describen en Höing *et al., Cell Stem Cell.* 2 De noviembre de 2012; 11(5):620-32.

- En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente bloquea el tráfico de linfocitos T, tal como al sistema nervioso central. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, bloquear el tráfico de linfocitos T puede reducir o evitar que las células inmunitarias crucen las paredes de los vasos sanguíneos hacia el sistema nervioso central, incluyendo que crucen la barrera hematoencefálica. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los linfocitos T específicos de antígeno activados producen citocinas proinflamatorias, incluyendo IFN- γ y TNF, tras la reactivación en el SNC, lo que conduce a la activación de células residentes tales como microglía y astrocitos. Véase Kivisäkk *et al., Neurology.* 2 De junio de 2009; 72(22): 1922-1930. Por lo tanto, en algunos casos que se divulgan en el presente documento, secuestrar linfocitos T activados de las células microgliales, tal como bloqueando el tráfico y/o inhibiendo la capacidad de dichas células para cruzar la barrera hematoencefálica, puede reducir o eliminar la activación microglial. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente inhibe las moléculas de adhesión en células inmunitarias, incluyendo los linfocitos T. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente inhibe una integrina. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la integrina es la integrina alfa-4. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es natalizumab (Tysabri®). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente modula un receptor

de superficie celular. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente modula el receptor de esfingosina-1-fosfato (S1P), tal como S1PR1 o S1PR5. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente provoca la internalización de un receptor celular, tal como un receptor de esfingosina-1-fosfato (S1P), tal como S1PR1 o S1PR5. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es fingolimod (Gilenya®) u ozanimod (RPC-1063).

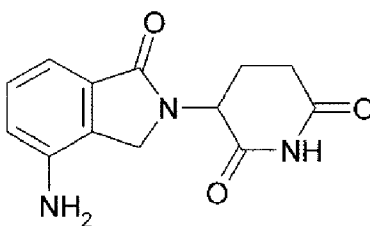
Se cree que el factor de transcripción NRF2 regula la respuesta antioxidante, por ejemplo, activando genes que contienen un elemento que actúa en cis en su región promotora. Un ejemplo de un elemento de este tipo incluye un elemento de respuesta antioxidante (ARE, por sus siglas en inglés). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente activa NRF2. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, activar NRF2 en las células microgliales reduce la capacidad de respuesta de las células microgliales a IFN y LPS. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la activación de NRF2 inhibe, ralentiza o reduce la desmielinización, la pérdida axonal, la muerte neuronal y/o la muerte de oligodendrocitos. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente regula positivamente la vía citoprotectora celular regulada por NRF2. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente que activa NRF2 es fumarato de dimetilo (Tecfidera®). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es cualquiera de los inhibidores que se describen en la patente de los EE.UU. número 8.399.514. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es cualquiera de los inhibidores que se describen en Höing *et al.*, *Cell Stem Cell*. 2 De noviembre de 2012; 11(5):620-32.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente que reduce la activación de las células microgliales es (4S,4aS,5aR,112aS)-4,7-bis(dimetilamino)-3,10,12,12a-tetrahidroxi-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidrotetraceno-2-carboxamida (minociclina) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma o derivados de la misma. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es cualquiera de los compuestos que se describen en la publicación de solicitud de patente de los EE.UU. número US20100190755. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es el siguiente compuesto:



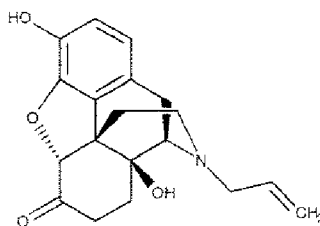
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente que reduce la activación de las células microgliales es 3-(7-amino-3-oxo-1H-isoindol-2-il)piperidina-2,6-diona (lenalidomida) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma o derivados de la misma. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es el siguiente compuesto:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

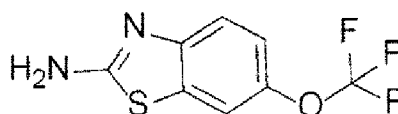
En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente que reduce la activación de las células microgliales es 4R,4aS,7aR,12bS)-4a,9-dihidroxi-3-prop-2-enil-2,4,5,6,7a,13-hexahidro-1H-4,12-metanobenzofuro[3,2-e]isoquinolin-7-ona (naloxona) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma o derivados de la misma. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es cualquiera de los compuestos que se describen en la patente de los EE.UU. número US8247425. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es el siguiente compuesto:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5 En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente que reduce la activación de las células microgliales es 2-amino-6-(trifluorometoxi)benzotiazol, 6-(trifluorometoxi)benzo[d]tiazol-2-amina o 6-(trifluorometoxi)-1,3-benzotiazol-2-amina (riluzol) o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos o derivados de los mismos como se describe en la patente de los EE.UU. número US5527814. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es el siguiente compuesto:

10

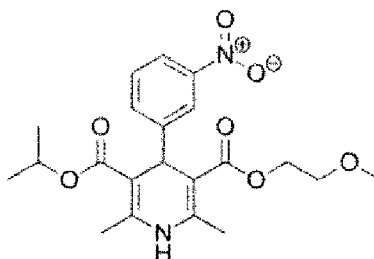


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 15 En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente que reduce la activación de las células microgliales es un modulador de una vía de señalización en la microglía. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente reduce la señalización de la microglía. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es un inhibidor de GM-CSF (CSF2). En otros casos que se divulgan en el presente documento, el agente que reduce la activación de las células microgliales es un bloqueante de los canales iónicos. En algunos casos específicos que se divulgan en el presente documento, el agente es un bloqueante de los canales de calcio. Por ejemplo, en algunos casos específicos que se divulgan en el presente documento, el agente es un bloqueante de los canales de calcio de dihidropiridina. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es un inhibidor del microARN. Por ejemplo, el agente se dirige a miR-155. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente que reduce la activación de las células microgliales se selecciona de MOR103, Nimodipino, IVIg y LNA-anti-miR-155 (Butovsky *et al.*, *Ann Neurol.*, 77(1):75-99 (2015) y Sanz *et al.*, *Br J Pharmacol.* 167(8): 1702-1711 (2012); Winter *et al.*, *Ann Clin and Transl Neurol.* 2328-9503 (2016); N.º de registro de estudio de ensayo clínico: NCT01517282, NCT00750867).

- 20 En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente que reduce la activación de las células microgliales es 2,6-dimetil-4-(3-nitrofenil)-1,4-dihidropiridina-3,5-dicarboxilato de 3-(2-metoxietilo) y 5-propan-2-ilo (nimodipino) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o derivados del mismo. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es cualquiera de los inhibidores que se describen en la patente de los EE.UU. número US3799934. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es el siguiente compuesto:

35



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 40 En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente que reduce la activación de las células microgliales se administra en una forma que sólo afecta al sistema nervioso central y/o no afecta a los macrófagos asociados a tumores. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente promueve la quiescencia de la microglía pero no elimina ni reduce el número de microglía. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el método implica inhibir la actividad de la microglía específicamente en el cerebro, tal como se describe en Ponomarev *et al.*, *Nature Medicine*, (1):64-70 (2011)

45

Se exponen agentes de ejemplo que reducen la activación de las células microgliales y pautas posológicas de ejemplo

para administrar dichos agentes, en la **Tabla 7** a continuación.

Tabla 7. Inhibidores de microglía y pautas posológicas de ejemplo			
Inhibidor de ejemplo	Tipo de molécula	Diana o dianas moleculares	Pauta o pautas posológicas de ejemplo
Pexidartinib (PLX3397)	molécula pequeña	CSF1R; c-Kit; FLT3	comprimidos de 200 mg, dos veces al día durante 28 días; Administrar diariamente como pauta posológica dividida, cinco niveles de dosis posibles en la parte de aumento a escala de dosis: 400 mg 5 días con 2 días de descanso (esquema intermitente), 400 mg, 600 mg, 800 mg o 1000 mg; 1000 mg/día durante 2 semanas y después 800 mg/día durante 22 semanas
Emactuzumab (RG1755; RO5509554)	anticuerpo monoclonal	CSF1R	100-3000 mg una vez cada 2 semanas
Cabiralizumab (FPA-008)	antiuerpo	CSF1R	Infusión intravenosa durante 30 minutos cada 2 semanas
LY-3022855 (IMC-CS4)	anticuerpo monoclonal	CSF1R	Suministro intravenoso de 1,25 mg/kg cada 2 semanas durante 6 semanas
JNJ-40346527	molécula pequeña	CSF1R	100 mg dos veces al día durante 12 semanas; cápsula de 100-1000 mg diariamente
MCS110	antiuerpo	MCSF (CSF1)	Hasta 4 dosis de MCS110 10 mg/kg administradas por vía intravenosa una vez cada 4 semanas a partir del Día 1
MOR103	antiuerpo	GM-CSF	6 dosis de 0,5-2,0 mg/kg durante 70 días
IVIg	inmunoglobulina	Desconocido	Infusión intravenosa de 0,4 g/kg cada mes durante 6 meses
Minociclina	molécula pequeña	antibiótico de amplio espectro: IL-1b; IL-6, TNF- α ; iNOS	Dosis oral de 100 mg de minociclina dos veces al día durante 24 meses
Naloxona	molécula pequeña	Receptores de opioides	Cápsulas de clorhidrato de naltrexona de 4,5 mg una vez/día durante 8 semanas
Lenalidomida/talidomida	molécula pequeña	Señalización de NFkB	100-400 mg diarios
Riluzol	molécula pequeña	Liberación de glutamato por microglía	50 mg dos veces al día
Cannabinoides/cannabidiol (por ejemplo, WIN55,212-2)	molécula pequeña	receptores de cannabinoides	Por vía oral 10 mg/kg/día durante 6 semanas (promedio de 700 mg/día)
Fumarato de dimetilo (Tecfidera®).	molécula pequeña	Señalización de Nrf2	Dosis inicial de 120 mg tomada por vía oral dos veces/día durante 7 días. La dosis aumentó a 240 mg tomados por vía oral dos veces/día a partir de entonces
natalizumab (Tysabri®)	antiuerpo	alfa-4 integrina	300 mg infundidos por vía intravenosa durante una hora, cada cuatro semanas
fingolimod (Gilenya®)	molécula pequeña	receptores de S1P, incluyendo S1PR1	0,5 mg por vía oral una vez al día
ozanimod (RPC-1063)	molécula pequeña	S1PR1 y S1PR5	0,25 mg, 0,5 mg o 1 mg una

			vez al día
--	--	--	------------

C. Otros agentes (por ejemplo, agentes de direccionamiento de citocinas)

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente, por ejemplo, agente dirigido a la toxicidad, que trata o mejora los síntomas de una toxicidad de inmunoterapia y/o una terapia celular, tal como CRS o neurotoxicidad, es uno que se dirige a una citocina, por ejemplo, es un antagonista o inhibidor de una citocina, tal como factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), IL-2, MIP1 β (CCL4), TNF alfa, IL-1, interferón gamma (IFN-gamma) o proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente que trata o mejora los síntomas de una toxicidad de una inmunoterapia y/o una terapia celular, tal como CRS o neurotoxicidad, es uno que se dirige (por ejemplo, inhibe o es un antagonista de) un receptor de citocinas, tal como receptor de IL-6 (IL-6R), receptor de IL-2 (IL-2R/CD25), receptor de MCP-1 (CCL2) (CCR2 o CCR4), un receptor de TGF-beta (TGF-beta I, II o III), receptor de IFN-gamma (IFNGR), receptor de MIP1 β (por ejemplo, CCR5), receptor de TNF alfa (por ejemplo, TNFR1), receptor de IL-1 (IL1-R α /IL-1R β) o receptor de IL-10 (IL-10R).

La cantidad de un agente seleccionado que trata o mejora los síntomas de una toxicidad de una inmunoterapia y/o una terapia celular, tal como CRS o neurotoxicidad que ha de administrarse para mejorar los síntomas o efectos adversos de una toxicidad a una inmunoterapia y/o una terapia celular, tal como CRS o neurotoxicidad, puede determinarse mediante técnicas clínicas convencionales. Los acontecimientos adversos de ejemplo incluyen, pero sin limitación, un aumento de la alanina aminotransferasa, un aumento de la aspartato aminotransferasa, escalofríos, neutropenia febril, cefalea, hipotensión, disfunción del ventrículo izquierdo, encefalopatía, hidrocefalia, crisis epiléptica y/o temblor.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente se administra en una cantidad de dosificación de desde o de aproximadamente 30 mg a 5000 mg, tal como de 50 mg a 1000 mg, de 50 mg a 500 mg, de 50 mg a 200 mg, de 50 mg a 100 mg, de 100 mg a 1000 mg, de 100 mg a 500 mg, de 100 mg a 200 mg, de 200 mg a 1000 mg, de 200 mg a 500 mg o de 500 mg a 1000 mg.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente se administra desde o de aproximadamente 0,5 mg/kg a 100 mg/kg, tal como desde o de aproximadamente 1 mg/kg hasta 50 mg/kg, de 1 mg/kg a 25 mg/kg, de 1 mg/kg a 10 mg/kg, de 1 mg/kg a 5 mg/kg, de 5 mg/kg a 100 mg/kg, de 5 mg/kg a 50 mg/kg, de 5 mg/kg a 25 mg/kg, de 5 mg/kg a 10 mg/kg, de 10 mg/kg a 100 mg/kg, de 10 mg/kg a 50 mg/kg, de 10 mg/kg a 25 mg/kg, de 25 mg/kg a 100 mg/kg, de 25 mg/kg a 50 mg/kg a 50 mg/kg a 100 mg/kg. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente se administra en una cantidad de dosificación de desde o de aproximadamente 1 mg/kg a 10 mg/kg, de 2 mg/kg a 8 mg/kg, de 2 mg/kg a 6 mg/kg, de 2 mg/kg a 4 mg/kg o de 6 mg/kg a 8 mg/kg, cada uno inclusive. En algunas divulgaciones, el agente se administra en una cantidad de dosificación de al menos o al menos aproximadamente o aproximadamente 1 mg/kg, 2 mg/kg, 4 mg/kg, 6 mg/kg, 8 mg/kg, 10 mg/kg o más. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente se administra a una dosis de 4 mg/kg u 8 mg/kg.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente se administra mediante inyección, por ejemplo, inyecciones intravenosas o subcutáneas, inyección intraocular, inyección periocular, inyección subretiniana, inyección intravítrea, inyección trans-septal, inyección subescleral, inyección intracoroidal, inyección intracameral, inyección subconjuntival, inyección subconjuntival, inyección subtenoniana, inyección retrobulbar, inyección peribulbar o suministro yuxtaescleral posterior. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, se administran por vía parenteral, por vía intrapulmonar e intranasal, y, si se desea para un tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la cantidad del agente se administra alrededor de o aproximadamente dos veces al día, diariamente, en días alternos, tres veces a la semana, semanalmente, en semanas alternas o una vez al mes.

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

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente que trata o mejora los síntomas de una toxicidad de la inmunoterapia y/o terapia celular, tal como CRS o neurotoxicidad, es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es tocilizumab, siltuximab, sarilumab, olokizumab (CDP6038), elsilimomab, ALD518/BMS-945429, sirukumab (CNTO 136), CPSI-2634, ARGX-109, FE301 o FM101.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es un antagonista o inhibidor de IL-6 o el receptor de IL-6 (IL-6R). En algunas divulgaciones, el agente es un anticuerpo que neutraliza la actividad de IL-6, tal como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une a IL-6 o IL-6R. Por ejemplo, en algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es o comprende tocilizumab (atlizumab) o sarilumab, anticuerpos anti-IL-6R. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es un anticuerpo anti-IL-6R que se describe en la Patente de los EE.UU. N.º 8.562.991. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente que se dirige a la IL-6 es un anticuerpo anti-IL-6, tal como siltuximab, elsilimomab, ALD518/BMS-945429, sirukumab (CNTO 136), CPSI-2634, ARGX-109, FE301, FM101 u olokizumab (CDP6038). En algunas divulgaciones, el agente puede neutralizar la actividad de IL-6 inhibiendo las interacciones ligando-receptor. La viabilidad de este tipo general de enfoque se ha demostrado con un antagonista de receptor de origen natural para interleucina-1. Véase Harmum, C. H. *et al.*, *Nature* (1990) 343:336-340. En algunas divulgaciones, el antagonista o inhibidor de IL-6/IL-6R es una muteína de IL-6, tal como una descrita en la Patente de los EE.UU. N.º 5591827. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente que es un antagonista o inhibidor de IL-6/IL-6R es una molécula pequeña, una proteína o péptido, a un ácido nucleico.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es tocilizumab. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el tocilizumab se administra como una intervención temprana de acuerdo con los métodos que se divulgan y/o con los artículos de fabricación o composiciones que se divulgan, a una dosificación de desde o de aproximadamente 1 mg/kg a 12 mg/kg, tal como exactamente o aproximadamente 4 mg/kg, 8 mg/kg o 10 mg/kg. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el tocilizumab se administra por infusión intravenosa. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, se administra tocilizumab para una fiebre persistente de más de 39 °C que dura 10 horas que no responde al acetaminofeno. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, se proporciona una segunda administración de tocilizumab si los síntomas reaparecen después de 48 horas de la dosis inicial.

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

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es un antagonista o inhibidor de MCP-1 (CCL2) o un receptor de MCP-1 (por ejemplo, receptor de MCP-1 CCR2 o CCR4). En algunas divulgaciones, el agente es un anticuerpo que neutraliza la actividad de MCP-1, tal como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une a MCP-1 o uno de sus receptores (CCR2 o CCR4). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el antagonista o inhibidor de MCP-1 es cualquiera que se describe en Gong *et al.* *J Exp Med.* 7 de Julio de 1997; 186(1): 131-137 o Shahrara *et al.* *J Immunol* 2008; 180:3447-3456. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente que es un antagonista o inhibidor de MCP-1 y/o su receptor (CCR2 o CCR4) es una molécula pequeña, una proteína o péptido, a un ácido nucleico.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es un antagonista o inhibidor de IFN- γ o un receptor de IFN- γ (IFNGR). En algunas divulgaciones, el agente es un anticuerpo que neutraliza la actividad de IFN- γ , tal como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une a IFN- γ o su receptor (IFNGR). En algunas divulgaciones, el anticuerpo neutralizante de IFN-gamma es cualquiera que se describe en Dobber *et al.* *Cell Immunol.* Febrero de 1995; 160(2): 185-92 u Ozmen *et al.* *J. Immunol.* 1 De abril de 1993; 150(7):2698-705. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente que es un antagonista o inhibidor de IFN- γ /IFNGR es una molécula pequeña, una proteína o péptido, a un ácido nucleico.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es un antagonista o inhibidor de IL-10 o el receptor de IL-10 (IL-10R). En algunas divulgaciones, el agente es un anticuerpo que neutraliza la actividad de IL-10, tal como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une a IL-10 o IL-10R. En algunas divulgaciones, el anticuerpo neutralizante de IL-10 es cualquiera que se describe en Dobber *et al.* *Cell Immunol.* Febrero de 1995; 160(2):185-92 o Hunter *et al.* *J. Immunol.* 1 De junio de 2005; 174(11):7368-75. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente que es un antagonista o inhibidor de IL-10/IL-10R es una molécula pequeña, una proteína o péptido, a un ácido nucleico.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es un antagonista o inhibidor de IL-1 o el receptor de IL-1 (IL-1R). En algunas divulgaciones, el agente es un antagonista del receptor de IL-1, que es una forma modificada de IL-1R, tal como anakinra (véase, por ejemplo, Fleischmann *et al.*, (2006) *Annals of the rheumatic diseases.* 65(8): 1006-12). En algunas divulgaciones, el agente es un anticuerpo que neutraliza la actividad de IL-1, tal como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une a IL-1 o IL-1R, tal como canakinumab (véase también el documento EP 2277543). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente que es un antagonista o inhibidor de IL-1/IL-1R es una molécula pequeña, una proteína o péptido, a un ácido nucleico.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es un antagonista o inhibidor de un factor de necrosis tumoral (TNF) o un receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR). En algunas divulgaciones, el agente es

un anticuerpo que bloquea la actividad de TNF, tal como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une a un TNF, tal como TNF α , o su receptor (TNFR, por ejemplo, TNFRp55 o TNFRp75). En algunas divulgaciones, el agente se selecciona de entre infliximab, adalimumab, certolizumab pegol, golimumab y etanercept. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente que es un antagonista o inhibidor de TNF/TNFR es una molécula pequeña, una proteína o péptido, a un ácido nucleico. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es una molécula pequeña que afecta al TNF, tal como lenalidomida (véase, por ejemplo, Muller *et al.* (1999) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 9 (11): 1625).

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es un antagonista o inhibidor de la señalización a través de la cascada de señalización de la cinasa Janus (JAK) y dos de Transductor de señal y activador de la transcripción (STAT). Las proteínas JAK/STAT son componentes comunes de la señalización de citocinas y receptores de citocinas. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente que es un antagonista o inhibidor de JAK/STAT, tal como ruxolitinib (véase, por ejemplo, Mesa *et al.* (2012) *Nature Reviews Drug Discovery*. 11(2):103-104), tofacitinib (también conocido como Xeljanz, Jakvinsu tasocitinib y CP-690550), Baricitinib (también conocido como LY-3009104, INCB-28050), Filgotinib (G-146034, GLPG-0634), Gandotinib (LY-2784544), Lestauritinib (CEP-701), Momelotinib (GS-0387, CYT-387), Pacritinib (SB1518) y Upadacitinib (ABT-494). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es una molécula pequeña, una proteína o péptido, a un ácido nucleico.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es un inhibidor de cinasas. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es un inhibidor de la tirosina cinasa de Bruton (BTK). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el inhibidor es o comprende ibrutinib o acalabrutinib (véase, por ejemplo, Barrett *et al.*, 58.^a Reunión Anual de ASH, San Diego, CA, 3-6 de diciembre de 2016, Resumen 654; Ruella *et al.*, 58.^a Reunión Anual de ASH, San Diego, CA, 3-6 de diciembre de 2016, Resumen 2159). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es un inhibidor como se describe en la Patente de los EE.UU. N.º 7.514.444; 8.008.309; 8.476.284; 8.497.277; 8.697.711; 8.703.780; 8.735.403; 8.754.090; 8.754.091; 8.957.079; 8.999.999; 9.125.889; 9.181.257; o 9.296.753.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, puede usarse un dispositivo, tal como la tecnología de resina absorbente con filtración de sangre o plasma, para reducir los niveles de citocinas. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el dispositivo utilizado para reducir los niveles de citocinas es un absorbedor de citocinas físico, tal como un absorbedor de citocinas extracorpóreo. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, puede usarse un absorbedor de citocinas físico para eliminar las citocinas del torrente sanguíneo de una manera extracorpórea *ex vivo*. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es un polímero poroso. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es CytoSorb (véase, por ejemplo, Basu *et al.* *Indian J Crit Care Med.* (2014) 18 (12): 822-824).

III. RECEPTORES DE ANTÍGENO RECOMBINANTES EXPRESADOS POR LAS CÉLULAS

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células para su uso o administradas en relación con los métodos que se divulgan contienen o se modifican por ingeniería genética para contener un receptor modificado por ingeniería genética, por ejemplo, un receptor de antígeno modificado por ingeniería genética, tal como un receptor de antígeno quimérico (CAR) o un receptor de linfocitos T (TCR). También se divulgan poblaciones de dichas células, composiciones que contienen dichas células y/o enriquecidas para dichas células, tal como en qué células de un determinado tipo, tal como linfocitos T o células CD8⁺ o CD4⁺ se enriquecen o seleccionan. Entre las composiciones se encuentran composiciones farmacéuticas y formulaciones para la administración, tal como para terapia celular adoptiva. También se divulgan métodos terapéuticos para administrar las células y composiciones a sujetos, por ejemplo, pacientes, de acuerdo con los métodos que se divulgan y/o con los artículos de fabricación o composiciones que se divulgan.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células incluyen uno o más ácidos nucleicos introducidos a través de ingeniería genética y, por lo tanto, expresan productos recombinantes o modificados genéticamente de dichos ácidos nucleicos. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la transferencia de genes se logra estimulando en primer lugar las células, tal como combinándolas con un estímulo que induce una respuesta tal como proliferación, supervivencia y/o activación, por ejemplo, medida por la expresión de una citocina o marcador de activación, seguido de la transducción de las células activadas y la expansión en cultivo a números suficientes para aplicaciones clínicas.

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

A. Receptores de antígenos quiméricos (CAR)

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los receptores quiméricos, tales como un receptor de antígeno quimérico, contienen uno o más dominios que combinan un dominio de unión a ligando (por ejemplo,

anticuerpo o fragmento de anticuerpo) que proporciona especificidad para un antígeno deseado (por ejemplo, antígeno tumoral) con dominios de señalización intracelular. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el dominio de señalización intracelular es una porción de dominio intracelular estimulador o activador, tal como un dominio estimulador o activador de linfocitos T, que proporciona una señal de activación primaria o una señal primaria.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el dominio de señalización intracelular contiene o contiene adicionalmente un dominio de señalización coestimuladora para facilitar las funciones efectoras. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los receptores quiméricos cuando se modifican genéticamente en células inmunitarias pueden modular la actividad de los linfocitos T y, en algunos casos que se divulgan en el presente documento, pueden modular la diferenciación u homeostasis de los linfocitos T, dando como resultado células modificadas genéticamente con una longevidad, una supervivencia y/o una persistencia *en vivo* mejoradas, tal como para su uso en métodos de terapia celular adoptiva.

Los receptores de antígenos de ejemplo, incluyendo los CAR, y los métodos para modificar por ingeniería genética e introducir dichos receptores en células, incluyen aquellos que se describen, por ejemplo, en las publicaciones de solicitud de patente internacional números WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061 las publicaciones de solicitud de patente de los EE.UU. números US2002131960, US2013287748, US20130149337, las Patentes de los 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 el número de solicitud de patente europea EP2537416y/o aquellos que se describen en 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 algunas divulgaciones, los receptores de antígeno incluyen un CAR como se describe en la Patente de los EE.UU. N.º: 7.446.190y aquellos que se describen en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N.º: WO/2014055668 A1. Los ejemplos de los CAR incluyen los CAR como se divulgan en cualquiera de las publicaciones mencionadas anteriormente, tales como WO2014031687, US 8.339.645, US 7.446.179, US 2013/0149337, la Patente de los EE.UU. N.º: 7.446.190, la Patente de los 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 lo documentos WO2014031687, US 8.339.645, US 7.446.179, US 2013/0149337, la Patente de los EE.UU. N.º: 7.446.190 y la Patente de los EE. UU. N.º: 8.389.282.

Los receptores quiméricos, tales como los CAR, generalmente incluyen un dominio de unión a antígeno extracelular, tal como una porción de una molécula de anticuerpo, generalmente una región de cadena pesada variable (V_H) y/o región de cadena ligera variable (V_L) del anticuerpo, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo scFv.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el antígeno dirigido por el receptor es un polipéptido. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, es un hidrato de carbono u otra molécula. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el antígeno se expresa selectivamente o se sobreexpresa en células de la enfermedad o afección, por ejemplo, las células tumorales o patógenas, en comparación con células o tejidos normales o no dirigidos. En otros casos que se divulgan en el presente documento, el antígeno se expresa en células normales y/o se expresa en las células modificadas.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el antígeno dirigido por el receptor se selecciona o comprende de entre 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 de cáncer de testículo, antígeno de cáncer/testículo 1B (CTAG, también conocido como NY-ESO-1 y LAGE-2), antígeno carcinoembrionario (CEA), una ciclina, ciclina A2, Ligando 1 de la quimiocina con motivo C-C (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD 123, CD133, CD138, CD171, proteoglicano 4 de sulfato de condroitina (CSPG4), proteína del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), mutación del receptor del factor de crecimiento epidérmico de tipo III (EGFR vIII), glicoproteína epitelial 2 (EPG-2), glicoproteína epitelial 40 (EPG-40), efrina B2, receptor de efrina A2 (EPHa2), receptor de estrógeno, 5 similar a receptor Fc (FCRL5; también conocido como homólogo 5 de receptor Fc o FCRH5), receptor de acetilcolina fetal (AChR fetal), una proteína de unión a folato (FPB), receptor de folato alfa, gangliósido GD2, GD2 O-acetilado (OGD2), gangliósido GD3, glicoproteína 100 (gp100), glicoproteína-3 (GPC3), miembro D del grupo 5 de clase C del receptor acoplado a proteína G (GPCR5D), Her2/neu (tirosina cinasa receptora erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), dímeros de erbB, Antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular humano (HMW-MAA), antígeno de superficie de hepatitis B, Antígeno leucocitario humano A1 (HLA-A1), Antígeno leucocitario humano A2 (HLA-A2), receptor de IL-22 alfa (IL-22R α), receptor de IL-13 alfa 2 (IL-13R $\alpha 2$), receptor de dominio de inserto de cinasa (kdr), cadena ligera kappa, molécula de adhesión celular L1 (L1-CAM), epítipo CE7 de L1-CAM, Repetición rica en leucina que contiene 8 miembros de la familia A (LRRc8A), Lewis Y, Antígeno asociado al melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, mesotelina (MSLN), c-Met, citomegalovirus murino (CMV), mucina 1 (MUC1), MUC16, ligandos del miembro D del grupo 2 citolítico natural (NKG2D), melan A (MART-1), molécula de adhesión de células neurales (NCAM), antígeno oncofetal, Antígeno de melanoma expresado preferentemente (PRAME), receptor de progesterona, un antígeno específico de la próstata, antígeno de células madre prostáticas (PSCA), antígeno de membrana específico de la próstata (AMEP), Receptor huérfano 1 similar a tirosina cinasa receptora (ROR1), survivina, Glicoproteína trofoblástica (TPBG también conocida como 5T4), glicoproteína 72 asociada a tumor (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 vascular endotelial (VEGFR2), Tumor de Wilms 1 (WT-1), un antígeno específico de patógeno o expresado por patógeno, o un antígeno asociado a un marcador universal, y/o moléculas biotiniladas, y/o moléculas expresadas por VIH, VHC, VHB u otros patógenos. Los antígenos dirigidos por los receptores en algunos casos que se divulgan en el presente documento incluyen antígenos asociados a una neoplasia maligna de linfocitos B, tal como cualquiera de un número de marcadores de linfocitos B conocidos. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el antígeno dirigido por el receptor es CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Igkappa, Iglambda, CD79a, CD79b o CD30. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el antígeno es o incluye un antígeno específico de patógeno o expresado por patógeno. En algunos casos que se divulgan 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 que se divulgan en el presente documento, el antígeno es CD19. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el scFv contiene un V_H y un V_L derivado de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo específico de CD19. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a CD19 es un anticuerpo derivado de ratón tal como FMC63 y SJ25C1. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es un anticuerpo humano, por ejemplo, como se describe en la Publicación de Patente de los EE.UU. N.º US 2016/0152723.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los dominios V_H y/o scFv derivan de FMC63. FMC63 generalmente se refiere a un anticuerpo IgG1 monoclonal de ratón originado contra células Nalm-1 y 16 que expresan CD19 de origen humano (Ling, N. R., *et al.* (1987). *Leucocyte typing III*. 302). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el anticuerpo FMC63 comprende una CDR-H1 y una CDR-H2 expuestas en las SEQ ID NO: 38 y 39, respectivamente, y una CDR-H3 expuesta en la SEQ ID NO: 40 o 54; y una CDR-L1 expuesta en la SEQ ID NO: 35 y una CDR-L2 expuesta en la SEQ ID NO: 36 o 55 y una CDR-L3 expuesta en la SEQ ID NO: 37 o 56. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el anticuerpo FMC63 comprende una región variable de cadena pesada (V_H) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41 y una región variable de cadena ligera (V_L) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el scFv comprende una cadena ligera variable que contiene una secuencia de CDR-L1 de la SEQ ID NO: 35, una secuencia de CDR-L2 de la SEQ ID NO: 36 y una secuencia de CDR-L3 de la SEQ ID NO: 37 y/o una cadena pesada variable que contiene una secuencia de CDR-H1 de la SEQ ID NO: 38, una secuencia de CDR-H2 de la SEQ ID NO: 39 y una secuencia de CDR-H3 de la SEQ ID NO: 40. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el scFv comprende una región de cadena pesada variable expuesta en la SEQ ID NO: 41 y una región de cadena ligera variable expuesta en la SEQ ID NO: 42. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las cadenas pesada variable y ligera variable están conectadas por un enlazador. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el enlazador se expone en la SEQ ID NO: 24. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el scFv comprende, en orden, una V_H , un enlazador y una V_L . En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el scFv comprende, en orden, una V_L , un enlazador y una V_H . En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el scFv está codificado por una secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 25 o una secuencia que presenta al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 25. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el scFv comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 43 o una secuencia que presenta al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 43.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el scFv deriva de SJ25C1. SJ25C1 es un anticuerpo IgG1 monoclonal de ratón originado contra células Nalm-1 y 16 que expresan CD19 de origen humano (Ling, N. R., *et al.* (1987). *Leucocyte typing III*. 302). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el anticuerpo SJ25C1 comprende una secuencia de CDR-H1, una de CDR-H2 y una de CDR-H3 expuestas en las SEQ ID NO: 47-49, respectivamente, y una secuencia de CDR-L1, una de CDR-L2 y una de CDR-L3 expuestas en las SEQ ID NO: 44-46, respectivamente. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el anticuerpo SJ25C1 comprende una región variable de cadena pesada (V_H) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 50 y una región variable de cadena ligera (V_L) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el scFv comprende una cadena ligera variable que contiene una secuencia de CDR-L1 de la SEQ ID NO: 44, una secuencia de CDR-L2 de la SEQ ID NO: 45 y una secuencia de CDR-L3 de la SEQ ID NO: 46 y/o una cadena pesada variable que contiene una secuencia de CDR-H1 de la SEQ ID NO: 47, una secuencia de CDR-H2 de la SEQ ID NO: 48 y una secuencia de CDR-H3 de la SEQ ID NO: 49. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el scFv comprende una región de cadena pesada variable expuesta en la SEQ ID NO: 50 y una región de cadena ligera variable expuesta en la SEQ ID NO: 51. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la cadena pesada variable y ligera variable están conectadas por un enlazador. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el enlazador se expone en la SEQ ID NO: 52. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el scFv comprende, en orden, una V_H , un

enlazador y una V_L. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el scFv comprende, en orden, una V_L, un enlazador y una V_H. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el scFv comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 53 o una secuencia que presenta al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 53.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el receptor de antígeno quimérico incluye una porción extracelular que contiene un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. En algunas divulgaciones, el receptor de antígeno quimérico incluye una porción extracelular que contiene el anticuerpo o fragmento y un dominio de señalización intracelular. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el anticuerpo o fragmento incluye un scFv.

El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio e incluye anticuerpos policlonales y monoclonales, incluyendo anticuerpos intactos y fragmentos de anticuerpos funcionales (de unión a antígeno), incluyendo fragmentos de unión a antígeno de fragmento (Fab), fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fab', fragmentos Fv, fragmentos de IgG recombinante (rIgG), regiones variables de cadena pesada (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 modificadas genéticamente y/o modificadas de otra manera de inmunoglobulinas, tales como intracuerpos, peptidocuerpos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos totalmente humanos, anticuerpos humanizados y anticuerpos heteroconjugados, anticuerpos multiespecíficos, por ejemplo, biespecíficos o triespecíficos, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos, di-scFv en tándem, tri-scFv en tándem. A menos que se indique otra cosa, debe entenderse que el término "anticuerpo" abarca fragmentos de anticuerpos funcionales del mismo también denominados en el presente documento "fragmentos de unión a antígeno". El término también abarca anticuerpos intactos o de longitud completa, incluyendo anticuerpos de cualquier clase o subclase, incluyendo IgG y subclases de la misma, IgM, IgE, IgA y IgD.

Las expresiones "región determinante de la complementariedad", y "CDR", sinónimas con "región hipervariable" o "HRV", se sabe, en algunos casos, que se refieren a secuencias no contiguas de aminoácidos dentro de regiones variables de anticuerpos, que confieren especificidad de antígeno y/o 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). Se sabe que "regiones marco conservadas" y "FR", en algunos casos, se refieren a las porciones no 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 de secuencia de aminoácidos precisos de una CDR o FR dada pueden determinarse fácilmente usando cualquiera de un número de esquemas bien conocidos, incluyendo aquellos 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 de "Kabat"); Al-Lazikani *et al.*, (1997) *JMB* 273:927-948 (esquema de numeración de "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 de "Contacto"); 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 de "IMGT"); Honegger A y Plückthun A, "*Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool*", *J Mol Biol*, 8 de junio de 2001; 309(3):657-70, (esquema de numeración de "Aho"); y Martin *et al.*, "*Modeling antibody hypervariable loops: a combined algorithm*", *PNAS*, 1989, 86(23):9268-9272, (esquema de numeración de "AbM").

Los límites de una CDR o FR dada pueden variar dependiendo del esquema utilizado 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 para los esquemas de Kabat y Chothia se basa en las longitudes de secuencia de región de anticuerpo más comunes, con inserciones acomodadas 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 una numeración diferencial. El esquema de contacto se basa en el análisis de estructuras cristalinas complejas y es similar en muchos aspectos al esquema de numeración de Chothia. El esquema de AbM es un compromiso entre las definiciones de Kabat y Chothia basándose en el utilizado por el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular.

La **Tabla 8**, a continuación, enumera límites de posición de ejemplo de CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 y CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3 como se identifica mediante los esquemas de Kabat, Chothia, AbM y Contacto, respectivamente. Para CDR-H1, la numeración de restos se enumera usando los esquemas de numeración de Kabat y de Chothia. Las FR se ubican entre las CDR, por ejemplo, con FR-L1 ubicada antes de CDR-L1, FR-L2 ubicada entre CDR-L1 y CDR-L2, FR-L3 ubicada entre CDR-L2 y CDR-L3 y así sucesivamente. Se observa que debido a que el esquema de numeración de Kabat mostrado coloca inserciones en H35A y H35B, el final del bucle de CDR-H1 de Chothia cuando se numera usando la convención de numeración de Kabat mostrada varía entre H32 y H34, dependiendo de la longitud del bucle.

Tabla 8. Límites de las CDR de acuerdo con diversos esquemas de numeración.

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

Por lo tanto, a menos que se especifique otra cosa, una "CDR" o "región determinante de la complementariedad", o CDR individuales especificadas (por ejemplo, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3), de un anticuerpo dado o región del mismo, tal como una región variable del mismo, debe entenderse que abarca una región determinante de la complementariedad (o la específica) como se define por cualquiera de los esquemas mencionados anteriormente u otros esquemas conocidos. Por ejemplo, donde se establece que una CDR particular (por ejemplo, una CDR-H3) contiene la secuencia de aminoácidos de una CDR correspondiente en una secuencia de aminoácidos de la región V_H o V_L dada, se entiende que una CDR de este tipo tiene una secuencia de la CDR correspondiente (por ejemplo, CDR-H3) dentro de la región variable, como se define por cualquiera de los esquemas mencionados anteriormente u otros esquemas conocidos. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, se especifican secuencias de CDR específicas. Se describen secuencias de CDR de ejemplo de anticuerpos que se divulgan usando diversos esquemas de numeración, aunque se entiende que un anticuerpo que se divulga puede incluir CDR como se describe de acuerdo con cualquiera de los otros esquemas de numeración mencionados anteriormente u otros esquemas de numeración conocidos por un experto en la materia.

Análogamente, a menos que se especifique otra cosa, debe entenderse que una FR o una o más FR individuales especificadas (por ejemplo, FR-H1, FR-H2, FR-H3, FR-H4), de un anticuerpo dado o región del mismo, tal como una región variable del mismo, abarcan una región marco conservada (o la específica) como se define por cualquiera de los esquemas conocidos. En algunos casos, se especifica el esquema para la identificación de una CDR, FR, o FR o CDR particulares, tales como la CDR definida por el método de Kabat, Chothia, AbM o Contacto, u otros esquemas conocidos. En otros casos que se divulgan en el presente documento, 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 ligera o pesada de anticuerpo que está implicada en la unión del antígeno al antígeno. Las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera (V_H y V_L, respectivamente) de un anticuerpo nativo tienen generalmente estructuras similares, comprendiendo cada una cuatro regiones marco conservadas (FR, por sus siglas en inglés) y tres CDR. (Véase, por ejemplo, Kindt *et al. Kuby Immunology*, 6.^a ed., W.H. Freeman and Co., página 91 (2007). Un único 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. Véase, por ejemplo, Portolano *et al.*, *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson *et al.*, *Nature* 352:624-628 (1991).

Entre los anticuerpos incluidos en los CAR que se divulgan se encuentran fragmentos de anticuerpos. Un "fragmento de anticuerpo" o "fragmento de unión a antígeno" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero sin limitación, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, diacuerpos; anticuerpos lineales; regiones variables de cadena pesada (V_H), moléculas de anticuerpos monocatenarios tales como scFv y anticuerpos de dominio único que comprenden solamente la región V_H; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el dominio de unión a antígeno en los CAR que se divulgan es o comprende un fragmento de anticuerpo que comprende una región de cadena pesada variable (V_H) y una región de cadena ligera variable (V_L). En casos particulares que se divulgan en el presente documento, los anticuerpos son fragmentos de anticuerpos monocatenarios que comprenden una región variable de cadena pesada (V_H) y/o una región variable de cadena ligera (V_L), tales como scFv.

La expresión "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena ligera o pesada de anticuerpo que está implicada en la unión del antígeno al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera (V_H y V_L, respectivamente) de un anticuerpo nativo tienen generalmente estructuras similares, comprendiendo cada una cuatro regiones marco conservadas (FR, por sus siglas en inglés) y tres CDR. (Véase, por ejemplo, Kindt *et al. Kuby Immunology*, 6.^a ed., W.H. Freeman and Co., página 91 (2007). Un único 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. Véase, 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 anticuerpos que comprenden todo o una porción del dominio variable de cadena pesada o todo o una porción del dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo. En determinados casos que se divulgan en el presente documento, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo de dominio único humano. En algunos casos que se divulgan 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 va a dirigir, tal como una célula tumoral o una célula cancerosa, tal como cualquiera de los antígenos diana que se describen en el presente documento o conocidos.

Los fragmentos de anticuerpos pueden fabricarse mediante diversas técnicas, incluyendo, pero sin limitación, digestión proteolítica de un anticuerpo intacto así como la producción por células hospedadoras recombinantes. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los anticuerpos son fragmentos producidos de forma recombinante, tales como fragmentos que comprenden disposiciones que no se producen de forma natural, tales como aquellos con dos o más regiones o cadenas de anticuerpo unidas por enlazadores sintéticos, por ejemplo, enlazadores peptídicos, y/o que no se pueden producir mediante digestión enzimática de un anticuerpo intacto de origen natural. En algunos casos que se divulgan 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 CDR derivan de CDR no humanas y todos o sustancialmente todos los restos de aminoácidos de FR derivan de FR humanas. Un anticuerpo humanizado puede incluir opcionalmente al menos una porción de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo no humano, se refiere a una variante del anticuerpo no humano que ha experimentado humanización, normalmente para reducir la inmunogenicidad para los seres humanos, conservando al mismo tiempo la especificidad y afinidad del anticuerpo no humano parental. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, algunos restos de FR en un anticuerpo humanizado se sustituyen con restos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que derivan los restos de CDR), por ejemplo, para restablecer o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la porción de anticuerpo del receptor recombinante, por ejemplo, CAR, incluye además al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina, tal como una región de bisagra, por ejemplo, una región bisagra de IgG4 y/o una región C_H1/C_L y/o Fc. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la región o porción constante es de una IgG humana, tal como IgG4 o IgG 1. En algunas divulgaciones, 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 a antígeno, en comparación con en ausencia del espaciador. Los espaciadores de ejemplo incluyen, pero sin limitación, aquellos descritos en Hudecek *et al.* (2013) *Clin. Cancer Res.*, 19:3153, la publicación de solicitud de patente internacional número WO2014031687, la Patente de los EE.UU. N.º 8.822.647 o la solicitud publicada N.º US2014/0271635.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la región o porción constante es de una IgG humana, tal como IgG4 o IgG1. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el espaciador tiene la secuencia ESKYGPPCPPCP (expuesta en la SEQ ID NO: 1) y está codificado por la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el espaciador tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 3. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el espaciador tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 4. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la región o porción constante es de IgD. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el espaciador tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 5. En algunos casos que se divulgan 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: 1, 3, 4, o 5. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el espaciador tiene la secuencia expuesta en las SEQ ID NO: 26-34. En algunos casos que se divulgan 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: 26-34.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el receptor de antígeno comprende un dominio intracelular unido directa o indirectamente al dominio extracelular. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el receptor de antígeno quimérico incluye un dominio transmembrana que une el dominio extracelular y el dominio de señalización intracelular. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el dominio de señalización intracelular comprende un ITAM. Por ejemplo, en algunas divulgaciones, el dominio de reconocimiento de antígeno (por ejemplo, dominio extracelular) generalmente está unido a uno o más componentes de señalización intracelular, tales como componentes de señalización que imitan la activación a través de un complejo receptor de antígeno, tal como un complejo de TCR, en el caso de un CAR y/o señal a través de otro receptor de superficie celular. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el receptor quimérico comprende un dominio transmembrana unido o fusionado entre el dominio extracelular (por ejemplo, scFv) y el dominio de señalización intracelular. Por lo tanto, en algunos casos que se divulgan en el presente documento, el componente de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpo) está unido a uno o más dominios de señalización transmembrana e intracelular.

En un caso que se divulga en el presente documento, se usa un dominio transmembrana que se asocia naturalmente a uno de los dominios en el receptor, por ejemplo, CAR. En algunos casos, el dominio transmembrana se selecciona o modifica mediante sustitución de aminoácidos para evitar la unión de dichos dominios a los dominios transmembrana de las mismas o diferentes proteínas de membrana de superficie para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor.

El dominio transmembrana en algunos casos que se divulgan en el presente documento deriva de una fuente natural o de una sintética. Cuando la fuente es natural, el dominio en algunas divulgaciones deriva de cualquier proteína unida a membrana o transmembrana. Las regiones transmembrana incluyen aquellas derivadas de (es decir, comprenden al menos la región o regiones transmembrana de) la cadena alfa, beta o zeta del receptor de linfocitos T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. Como alternativa, el dominio transmembrana en algunos casos que se divulgan en el presente documento es sintético. En algunas divulgaciones, el dominio transmembrana sintético comprende predominantemente restos hidrófobos tales como leucina y valina. En algunas divulgaciones, se encontrará un triplete de fenilalanina, triptófano y valina en cada extremo de un dominio transmembrana sintético. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el enlace es mediante enlazadores, espaciadores y/o uno o más dominios transmembrana. En algunas divulgaciones, el dominio transmembrana contiene una porción transmembrana de CD28.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el dominio extracelular y el dominio transmembrana pueden unirse directa o indirectamente. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el dominio extracelular y transmembrana se unen mediante un espaciador, tal como cualquiera que se describe en el presente documento. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el receptor contiene una porción extracelular de la molécula de la que deriva el dominio transmembrana, tal como una porción extracelular de CD28.

Entre los dominios de señalización intracelular se encuentran aquellos que imitan o se aproximan a una señal a través de un receptor de antígeno natural, una señal a través de un receptor de este tipo en combinación con un receptor coestimulador y/o una señal a través de un receptor coestimulador solo. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, hay presente un enlazador de oligo 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, y forma un enlace entre el dominio transmembrana y el dominio de señalización citoplasmática del CAR.

La activación de linfocitos T se describe en algunas divulgaciones como mediada por dos clases de secuencias de señalización citoplasmáticas: las que inician la activación primaria dependiente de antígeno a través del TCR (secuencias de señalización citoplasmática primaria) y aquellas que actúan de manera independiente de antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora (secuencias de señalización citoplasmática secundaria). En algunas divulgaciones, el CAR incluye uno o ambos de dichos componentes de señalización.

El receptor, por ejemplo, el CAR, generalmente incluye al menos un componente o componentes de señalización intracelular. En algunas divulgaciones, el CAR incluye una secuencia de señalización citoplasmática primaria que regula la activación primaria del complejo de TCR. Las secuencias de señalización citoplasmática primaria que actúan de manera estimuladora pueden contener motivos de señalización que se conocen como motivos de activación basados en tirosina inmunorreceptores o ITAM. Los ejemplos de ITAM que contienen secuencias de señalización citoplasmática primaria incluyen las derivadas de la cadena CD3 zeta, FcR gamma, CD3 gamma, CD3 delta y CD3 épsilon. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la molécula o moléculas de señalización citoplasmática en el CAR contiene o contienen un dominio de señalización citoplasmática, porción del mismo o secuencia derivada de CD3 zeta.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el receptor incluye un componente intracelular de un complejo de TCR, tal como una cadena de CD3 de TCR que media la activación y citotoxicidad de linfocitos T, por ejemplo, cadena CD3 zeta. Por lo tanto, en algunas divulgaciones, la porción de unión a antígeno está unida a uno o más módulos de señalización celular. En algunos casos que se divulgan 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 que se divulgan en el presente documento, el receptor, por ejemplo, CAR, incluye además una porción de una o más moléculas adicionales tales como receptor de Fc gamma, CD8, CD4, CD25 o CD 16. Por ejemplo, en algunas divulgaciones, el CAR u otro receptor quimérico incluye una molécula quimérica entre CD3-zeta (CD3-ζ) o receptor de Fc gamma y CD8, CD4, CD25 o CD16.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, tras la ligadura del CAR u otro receptor quimérico, el dominio citoplasmático o dominio de señalización intracelular del receptor activa al menos una de las funciones o respuestas efectoras normales de la célula inmunitaria, por ejemplo, linfocito T modificado por ingeniería genética 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 T auxiliar, tal como la secreción de citocinas u otros factores. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, se usa una porción truncada de un dominio de señalización intracelular de un componente receptor de antígeno o molécula coestimuladora en lugar de una cadena inmunoestimuladora intacta, por ejemplo, si transduce la señal de función efectora. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el dominio o dominios de señalización intracelular incluyen las secuencias citoplasmáticas del receptor de linfocitos T (TCR) y, en

algunas divulgaciones, también aquellas de los correceptores que, en el contexto natural, actúan en conjunto con dichos receptores para iniciar la transducción de señales después del acoplamiento del receptor de antígeno.

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

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el receptor de antígeno quimérico contiene un dominio intracelular de una molécula coestimuladora de linfocitos T. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el CAR incluye un dominio de señalización y/o porción transmembrana de un receptor coestimulador, tal como CD28, 4-1BB, OX40, DAP10 e ICOS. En algunas divulgaciones, el mismo CAR incluye tanto los componentes activadores como coestimuladores. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el receptor de antígeno quimérico contiene un dominio intracelular derivado de una molécula coestimuladora de linfocitos T o una variante funcional de la misma, tal como entre el dominio transmembrana y el dominio de señalización intracelular. En algunas divulgaciones, la molécula coestimuladora de linfocitos T es CD28 o 41BB.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el dominio activador está incluido dentro de un CAR, mientras que el componente coestimulador lo proporciona otro CAR que reconoce otro antígeno. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los CAR incluyen CAR activadores o estimuladores, CAR coestimuladores, ambos expresados en la misma célula (véase el documento WO2014/055668). En algunas divulgaciones, las células incluyen uno o más CAR estimuladores o activadores y/o un CAR coestimulador. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células incluyen además CAR inhibidores (iCAR, véase Fedorov *et al.*, *Sci. Transl. Medicine*, 5(215) (Diciembre de 2013), tal como un CAR que reconoce un antígeno distinto del asociado a y/o específico para la enfermedad o afección por lo que una señal activadora suministrada a través del CAR dirigido a la enfermedad se disminuye o inhibe mediante la unión del CAR inhibidor a su ligando, por ejemplo, para reducir los efectos inespecíficos.

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

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el CAR abarca uno o más, por ejemplo, dos o más, dominios coestimuladores y un dominio de activación, por ejemplo, dominio de activación primaria, en la porción citoplasmática. Los CAR de ejemplo incluyen componentes intracelulares de CD3-zeta, CD28 e 4-1BB.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el vector que codifica el receptor de antígeno y/o las células que expresan el CAR u otro receptor de antígeno incluyen además una secuencia de ácido nucleico que codifica uno o más marcadores. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el uno o más marcadores es un marcador de transducción, marcador sustituto y/o un marcador de selección. En algunas realizaciones, el marcador es un marcador sustituto, tal como un marcador de superficie celular, que puede usarse para confirmar la transducción o modificación por ingeniería genética de la célula para expresar el receptor

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el marcador es un marcador de transducción o un marcador sustituto. Puede usarse un marcador de transducción o un marcador sustituto para detectar células que se han introducido con el polinucleótido, por ejemplo, un polinucleótido que codifica un receptor recombinante. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el marcador de transducción puede indicar o confirmar la modificación de una célula. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el marcador sustituto es una proteína que se fabrica para coexpresarse en la superficie celular con el receptor recombinante, por ejemplo, CAR. En casos particulares que se divulgan en el presente documento, un marcador sustituto de este tipo es una proteína de superficie que se ha modificado para tener poca o ninguna actividad. En determinados casos que se divulgan en el presente documento, el marcador sustituto está codificado en el mismo polinucleótido que codifica el receptor recombinante. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la secuencia de ácido nucleico que codifica el receptor recombinante está unida operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica un marcador, separado opcionalmente por un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES, por sus siglas en inglés), o un ácido nucleico que codifica un péptido de autoescisión o un péptido que provoca la omisión ribosómica, tal como una secuencia 2A, tal como una T2A, una P2A, una E2A o una F2A. En algunos casos que se divulgan en el presente documento pueden utilizarse genes marcadores extrínsecos en relación con células modificadas por ingeniería genética para permitir la detección o selección de células y, en algunos casos que se divulgan en el presente documento, también para promover el suicidio celular.

Los marcadores sustitutos de ejemplo pueden incluir formas truncadas de polipéptidos de superficie celular, tales como formas truncadas que no son funcionales y que no se transducen o no son capaces de transducir una señal o

una señal habitualmente transducida por la forma de longitud completa del polipéptido de superficie celular, y/o no se internalizan o son capaces internalizarse. Los polipéptidos de superficie celular truncados de ejemplo que incluyen formas truncadas de factores de crecimiento u otros receptores tales como un receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano truncado (tHER2), un receptor del factor de crecimiento epidérmico truncado (tEGFR, secuencia de tEGFR de ejemplo expuesta en la SEQ ID NO: 11 o 76) o un antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) o una forma modificada del mismo. tEGFR puede contener un epítipo reconocido por el anticuerpo cetuximab (Erbix[®]) u otro anticuerpo anti-EGFR o molécula de unión terapéuticos, que puede usarse para identificar o seleccionar células que se han modificado por ingeniería genética con la construcción de tEGFR y una proteína exógena codificada, y/o para eliminar o separar células que expresan la proteína exógena codificada. Véase la Patente de los EE.UU. N.º 8.802.374 y Liu *et al.*, *Nature Biotech.* Abril de 2016; 34(4): 430-434). En algunas divulgaciones, el marcador, por ejemplo, marcador sustituto, incluye todo o parte (por ejemplo, forma truncada) de CD34, un NGFR, un CD19 o un CD19 truncado, por ejemplo, un CD19 no humano truncado o receptor del factor de crecimiento epidérmico (por ejemplo, tEGFR). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el marcador es o comprende una proteína fluorescente, tal como proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente verde potenciada (GFP), tal como GFP superplegada (sfGFP), proteína fluorescente roja (RFP), tal como tdTomato, mCherry, mStrawberry, AsRed2, DsRed o DsRed2, proteína fluorescente cian (CFP), proteína fluorescente verde azulada (BFP), proteína fluorescente azul potenciada (EBFP) y proteína fluorescente amarilla (YFP) y variantes de las mismas, incluyendo variantes de especies, variantes monoméricas y variantes con codones optimizados y/o potenciadas de las proteínas fluorescentes. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el marcador es o comprende una enzima, tal como una luciferasa, el gen lacZ de *E. coli*, fosfatasa alcalina, fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP), cloranfenicol acetil transferasa (CAT). Los genes indicadores emisores de luz de ejemplo incluyen luciferasa (luc), β -galactosidasa, cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), β -glucuronidasa (GUS) o variantes de las mismas.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el marcador es un marcador de selección. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el marcador de selección es o comprende un polipéptido que confiere resistencia a agentes o fármacos exógenos. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el marcador de selección es un gen de resistencia a antibióticos. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el marcador de selección es un gen de resistencia a antibióticos que confiere resistencia a antibióticos a una célula de mamífero. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el marcador de selección es o comprende un gen de resistencia a puromicina, un gen de resistencia a higromicina, un gen de resistencia a blasticidina, un gen de resistencia a neomicina, un gen de resistencia a geneticina o un gen de resistencia a zeocina o una forma modificada de los mismos.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la molécula es una molécula no propia, por ejemplo, proteína no propia, es decir, una que no es reconocida como "propia" por el sistema inmunitario del hospedador al que se le transferirán adoptivamente las células.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el marcador no cumple ninguna función terapéutica y/o no produce ningún otro efecto que no sea su uso como marcador para la modificación por ingeniería genética, por ejemplo, para seleccionar células modificadas por ingeniería genética satisfactoriamente. En otros casos que se divulgan en el presente documento, el marcador puede ser una molécula terapéutica o una molécula que ejerza de otro modo algún efecto deseado, tal como un ligando para que una célula se encuentre *in vivo*, tal como una molécula coestimuladora o de punto de control inmunitario para potenciar y/o amortiguar las respuestas de las células tras la transferencia adoptiva y el encuentro con el ligando.

En algunos casos que se divulgan 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, una T2A. Por ejemplo, un marcador y, opcionalmente, una secuencia enlazadora, puede ser cualquiera divulgado en la Publicación PCT N.º WO2014031687. Por ejemplo, el marcador puede ser un EGFR truncado (tEGFR) que está, opcionalmente, unido a una secuencia enlazadora, tal como una secuencia enlazadora escindible de T2A.

Un polipéptido de ejemplo para un EGFR truncado (por ejemplo, tEGFR) comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 7 o 16 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 la SEQ ID NO: 7 o 16. Una secuencia enlazadora de T2A de ejemplo comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6 o 17 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 la SEQ ID NO: 6 o 17.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el marcador es una molécula, por ejemplo, proteína de superficie celular, que no se encuentra de forma natural en los linfocitos T o no se encuentra de forma natural en la superficie de los linfocitos T, o una porción de los mismos.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los CAR se denominan CAR de primera, de segunda y/o de tercera generación. En algunas divulgaciones, un CAR de primera generación es uno que proporciona

únicamente una señal inducida por la cadena CD3 tras la unión a antígeno; en algunas divulgaciones, un CAR de segunda generación es uno que proporciona una señal y una señal coestimuladora de este tipo, tal como uno que incluye un dominio de señalización intracelular de un receptor coestimulador tal como CD28 o CD137; en algunas divulgaciones, un CAR de tercera generación es uno que incluye múltiples dominios coestimuladores de diferentes receptores coestimuladores.

Por ejemplo, en algunos casos que se divulgan 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 variante funcional del mismo y una porción de señalización de CD3 zeta o variante funcional del mismo. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el CAR contiene un anticuerpo, por ejemplo, fragmentos de anticuerpos, un dominio transmembrana que es o contiene una porción transmembrana de CD28 o una variante funcional del mismo, y un dominio de señalización intracelular que contiene una porción de señalización de un 4-1BB o variante funcional del mismo y una porción de señalización de CD3 zeta o variante funcional del mismo. En algunos de dichos casos que se divulgan 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 solamente de bisagra.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el dominio transmembrana del receptor recombinante, por ejemplo, el CAR, es o incluye un dominio transmembrana de CD28 humano (por ejemplo, N.º de acceso P01747.1) o variante del mismo, tal como un dominio transmembrana que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 8 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 la SEQ ID NO: 8; en algunos casos que se divulgan en el presente documento, la porción que contiene dominio transmembrana del receptor recombinante comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos exactamente 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 que se divulgan en el presente documento, el componente o componentes de señalización intracelular del receptor recombinante, por ejemplo, el CAR, contiene un dominio de señalización coestimuladora intracelular de CD28 humano o una variante funcional o porción del mismo, tal como un dominio con una sustitución de LL a GG en las posiciones 186-187 de una proteína CD28 nativa. Por ejemplo, el dominio de señalización intracelular puede comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 10 u 11 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 la SEQ ID NO: 10 u 11. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el dominio intracelular comprende un dominio de señalización coestimuladora intracelular de 4-1BB (por ejemplo, N.º de acceso Q07011.1) o variante funcional o porción del mismo, tal como la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 12 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 la SEQ ID NO: 12.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el dominio de señalización intracelular del receptor recombinante, por ejemplo, el CAR, comprende un dominio de señalización estimuladora de CD3 zeta humano o una variante funcional del mismo, tal como un dominio citoplasmático de 112 AA de la isoforma 3 de CD3ζ humano (N.º de acceso: P20963.2) o un dominio de señalización CD3 zeta como se describe en la Patente de los EE.UU. N.º: 7.446.190 o la Patente de los EE.UU. N.º 8.911.993. Por ejemplo, en algunos casos que se divulgan en el presente documento, el dominio de señalización intracelular comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 13, 14 o 15 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 la SEQ ID NO: 13, 14 o 15.

En algunas divulgaciones, el espaciador contiene solamente una región bisagra de una IgG, tal como solamente una bisagra de IgG4 o IgG1, tal como el espaciador solamente de bisagra expuesto en la SEQ ID NO: 1. En otros casos que se divulgan en el presente documento, el espaciador es o contiene una bisagra de Ig, por ejemplo, una bisagra derivada de IgG4, opcionalmente unida a un dominio C_H2 y/o C_H3. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el espaciador es una bisagra de Ig, por ejemplo, una bisagra de IgG4, unida a dominios C_H2 y C_H3, tal como se expone en la SEQ ID NO: 4. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el espaciador es una bisagra de Ig, por ejemplo, una bisagra de IgG4, unida a un dominio C_H3 solamente, tal como se expone en la SEQ ID NO: 3. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el espaciador es o comprende una secuencia rica en glicina-serina u otro enlazador flexible tal como enlazadores flexibles conocidos.

Por ejemplo, en algunos casos que se divulgan en el presente documento, el CAR incluye un anticuerpo tal como un fragmento de anticuerpo, incluyendo scFv, un espaciador, tal como un espaciador que contiene una porción de una molécula de inmunoglobulina, tal como una región bisagra y/o una o más regiones constantes de una molécula de cadena pesada, tal como un espaciador que contiene bisagra de Ig, un dominio transmembrana que contiene todo o una porción de un dominio transmembrana derivado de CD28, un dominio de señalización intracelular derivado de

CD28 y un dominio de señalización de CD3 zeta. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el CAR incluye un anticuerpo o fragmento, tal como scFv, un espaciador tal como cualquiera de los espaciadores que contienen bisagra de Ig, un dominio transmembrana derivado de CD28, un dominio de señalización intracelular derivado de 4-1BB y un dominio de señalización derivado de CD3 zeta.

En casos particulares que se divulgan en el presente documento, el CAR es un CAR dirigida a CD19 que contiene un dominio de unión a antígeno scFv de FMC63; un espaciador de bisagra de inmunoglobulina, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que contiene una región de señalización coestimuladora que es un dominio de señalización de 4-1BB y un dominio de señalización de una cadena CD3-zeta (CD3ζ). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el scFv contiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 43. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el scFv tiene un VL que tiene CDR que tienen una secuencia de aminoácidos RASQDISKYLN (SEQ ID NO: 35), una secuencia de aminoácidos de SRLHSGV (SEQ ID NO: 36) y una secuencia de aminoácidos de GNTLPYTFG (SEQ ID NO: 37); y un VH con CDR que tienen una secuencia de aminoácidos de DYGVVS (SEQ ID NO: 38), una secuencia de aminoácidos de VIWGSETTYNSALKS (SEQ ID NO: 39) y YAMDYWG (SEQ ID NO: 40). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el dominio transmembrana tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 8. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el dominio transmembrana tiene una secuencia que tiene 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: 8. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el dominio de señalización coestimuladora 4-1BB tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 12. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el dominio de señalización coestimuladora 4-1BB tiene una secuencia con 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: 12. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el dominio CD3-zeta tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 13. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el dominio de señalización CD3zeta tiene una secuencia que tiene al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con la misma. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el CAR dirigido a CD19 se une a CD 19 y media la producción de citocinas y/o la actividad citotóxica contra las células diana CD19+ cuando se expresa en un linfocito T y se estimula a través del CAR, tal como mediante la unión a CD 19.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las moléculas de ácido nucleico que codifican dichas construcciones de CAR incluyen además una secuencia que codifica un elemento de omisión ribosómica T2A y/o una secuencia de tEGFR, por ejemplo, en dirección 3' de la secuencia que codifica el CAR. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la secuencia codifica un elemento de omisión ribosómica T2A expuesto en la SEQ ID NO: 6 o 17, 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 la SEQ ID NO: 6 u 17. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, también pueden generarse linfocitos T que expresan un receptor de antígeno (por ejemplo, CAR) para expresar un EGFR truncado (EGFRt) como un epítipo de selección no inmunogénico (por ejemplo, mediante la introducción de una construcción que codifica el CAR y el EGFRt separados por un interruptor de ribosoma T2A para expresar dos proteínas de la misma construcción), que después puede usarse como un marcador para detectar dichas células (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 8.802.374). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la secuencia codifica una secuencia de tEGFR expuesta en la SEQ ID NO: 7 o 16, 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 la SEQ ID NO: 7 u 16.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, un único promotor puede dirigir la expresión de un ARN que contiene, en un único marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés), dos o tres genes (por ejemplo, que codifican la molécula implicada en la modulación de una vía metabólica y que codifican el receptor recombinante) separados entre sí por secuencias que codifican un péptido de autoescisión (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 las proteínas individuales. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el péptido, tal como T2A, puede provocar que el ribosoma omita (omisión ribosómica) la síntesis de un enlace peptídico en el extremo C-terminal de un elemento 2A, conduciendo a la separación entre el final de la secuencia 2A y el siguiente péptido en dirección 3' (véase, por ejemplo, de Felipe. *Genetic Vaccines and Ther.* 2:13 (2004) y de Felipe *et al. Traffic* 5:616-626 (2004)). Se conocen muchos elementos 2A. Se divulgan en el presente documento ejemplos de secuencias 2A que pueden usarse en los métodos y ácidos nucleicos, sin limitación, 2A secuencias del virus de la fiebre aftosa (F2A, por ejemplo, SEQ ID NO: 21), virus de la rinitis A equina (E2A, por ejemplo, SEQ ID NO: 20), virus Thossea asigna (T2A, por ejemplo, SEQ ID NO: 6 o 17) y teschovirus-1 porcino (P2A, por ejemplo, SEQ ID NO: 18 o 19) como se describe en la Publicación de Patente de los EE.UU. N.º 20070116690.

Los receptores recombinantes, tales como los CAR, expresados por las células administradas al sujeto generalmente reconocen o se unen específicamente a una molécula que se expresa en, se asocia a y/o es específica para la enfermedad o afección o células de la misma que se están tratando. Tras la unión específica a la molécula, por ejemplo, antígeno, el receptor generalmente envía una señal inmunoestimuladora, tal como una señal transducida por

ITAM, en la célula, promoviendo de ese modo una respuesta inmunitaria dirigida a la enfermedad o afección. Por ejemplo, en algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células expresan un CAR que se une específicamente a un antígeno expresado por una célula o tejido de la enfermedad o afección o asociado a la enfermedad o afección.

B. Receptores de linfocitos T (TCR)

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células modificadas por ingeniería genética, tales como linfocitos T, utilizadas en relación con los métodos, usos, artículos de fabricación o composiciones que se divulgan son células 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 un antígeno de una proteína tumoral, vírica o autoinmunitaria.

En algunos casos que se divulgan 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 γ y TCR δ , respectivamente), o porciones de unión a antígeno de las mismas, y que es capaz de unirse específicamente a un péptido unido a una molécula de MHC. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el TCR está en la forma $\alpha\beta$. Normalmente, los TCR que existen en las formas $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ son generalmente estructuralmente similares, pero los linfocitos T que las expresan pueden tener distintas ubicaciones o funciones anatómicas. Un TCR puede encontrarse en la superficie de una célula o en forma soluble. En general, un TCR se encuentra en la superficie de los linfocitos T (o células T) donde generalmente es responsable de reconocer antígenos unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés).

A menos que se indique otra cosa, debe entenderse que el término "TCR" abarca TCR completos, así como porciones de unión a antígeno o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el TCR es un TCR intacto o de longitud completa, incluyendo TCR en la forma $\alpha\beta$ o forma $\gamma\delta$. En algunos casos que se divulgan 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 de MHC, tal como se une a un complejo MHC-péptido. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, una porción o fragmento de unión a antígeno de un TCR puede contener solamente una porción de los dominios estructurales de un TCR de longitud completa o intacto, 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 que se divulgan en el presente documento, 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, suficientes para formar un sitio de unión para unirse a un complejo MHC-péptido específico. En general, las cadenas variables de un TCR contienen regiones determinantes de la complementariedad implicadas en el reconocimiento del péptido, MHC y/o complejo MHC-péptido.

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

En algunos casos que se divulgan 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 algunas divulgaciones, cada cadena del TCR puede poseer un dominio variable de inmunoglobulina N-terminal, un dominio constante de inmunoglobulina, una región transmembrana y una cola citoplasmática corta en el extremo C-terminal. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, un TCR está asociado a proteínas invariantes del complejo CD3 implicadas en la mediación de la transducción de señales.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, una cadena de TCR contiene uno o más dominios constantes. Por ejemplo, la porción extracelular de una cadena de TCR dada (por ejemplo, cadena α o cadena β)

puede contener dos dominios similares a inmunoglobulina, tales como un dominio variable (por ejemplo, V α o V β ; normalmente los aminoácidos 1 a 116 basados en la numeración de Kabat, Kabat *et al.*, "*Sequences of Proteins of Immunological Interest*", Departamento de Salud y Servicios Sociales de los EE.UU., Servicio de Salud Pública Institutos Nacionales de Salud, 1991, 5.^a ed.) y un dominio constante (por ejemplo, dominio constante de cadena α o C α , normalmente las posiciones 117 a 259 de la cadena basadas en la numeración de Kabat o el dominio constante de la cadena β o C β , normalmente las posiciones 117 a 295 de la cadena basadas en Kabat) adyacentes a la membrana celular. Por ejemplo, en algunos casos que se divulgan en el presente documento, 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, dominios variables que contienen cada uno CDR. El dominio constante del TCR puede contener secuencias de conexión cortas en las que un resto cisteína forma un enlace disulfuro, uniendo así las dos cadenas del TCR. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, un TCR puede tener un resto cisteína adicional en cada una de las cadenas α y β , de manera que el TCR contiene dos enlaces disulfuro en los dominios constantes.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las cadenas de TCR contienen un dominio transmembrana. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el dominio transmembrana tiene carga positiva. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la cadena de TCR contiene una cola citoplasmática. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, 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 basados en tirosina inmunorreceptores o ITAM que están implicados en la capacidad de señalización del complejo de TCR.

En algunos casos que se divulgan 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 que se divulgan en el presente documento, el TCR es un heterodímero que contiene dos cadenas separadas (cadenas α y β o cadenas γ y δ) que están unidas, tal como por un enlace disulfuro o enlaces disulfuro.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el TCR puede generarse a partir de una o más secuencias de TCR conocidas, tales como secuencias de cadenas V α , β , para las que hay fácilmente disponible una secuencia codificante sustancialmente de longitud completa. Los métodos para obtener secuencias de TCR de longitud completa, incluyendo secuencias de cadenas V, de fuentes celulares, son bien conocidas. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los ácidos nucleicos que codifican el TCR pueden obtenerse de una diversidad de fuentes, tal como mediante la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de ácidos nucleicos que codifican TCR dentro o aislados de una célula o células dadas, o la síntesis de secuencias de ADN de TCR disponibles públicamente.

En algunos casos que se divulgan 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 disponible públicamente. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los linfocitos T pueden obtenerse a partir de células aisladas *in vivo*. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el TCR es un TCR seleccionado típicamente. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el TCR es un TCR restringido por neoepítipo. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los linfocitos T pueden ser un hibridoma o clon de linfocitos T cultivados. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el TCR o porción de unión a antígeno del mismo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede generarse sintéticamente a partir del conocimiento de la secuencia del TCR.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el TCR se genera a partir de un TCR identificado o seleccionado a partir del cribado de una biblioteca de TCR candidatos contra un antígeno polipeptídico diana, o un epítipo de linfocito T diana del mismo. Las bibliotecas de TCR pueden generarse mediante la amplificación del repertorio de V α y V β a partir de linfocitos T aislados de un sujeto, incluyendo las células presentes en las PBMC, bazo u otro órgano linfóide. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los linfocitos T pueden amplificarse a partir de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL, por sus siglas en inglés). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las bibliotecas de TCR pueden generarse a partir de células CD4⁺ o CD8⁺. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los TCR pueden amplificarse a partir de una fuente de linfocitos T de un sujeto normal o sano, es decir, bibliotecas de TCR normales. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los TCR pueden amplificarse a partir de una fuente de linfocitos T de un sujeto enfermo, es decir, bibliotecas de TCR enfermas. En algunos casos que se divulgan 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, obtenidos de seres humanos. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las bibliotecas de scTv pueden ensamblarse a partir de bibliotecas de V α y V β sin activación previa en las que los productos amplificados se clonan o ensamblan para separarse mediante un enlazador. Dependiendo de la fuente del sujeto y las células, las bibliotecas pueden ser específicas de alelo de HLA. Como alternativa, en algunos casos que se divulgan en el presente documento, las bibliotecas de TCR pueden generarse mediante mutagénesis o diversificación de una

molécula de TCR parental o de armazón. En algunas divulgaciones, los TCR se someten a evolución dirigida, tal como mediante mutagénesis, por ejemplo, de la cadena α o β . En algunas divulgaciones, se alteran restos particulares dentro de las CDR del TCR. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los TCR seleccionados pueden modificarse mediante maduración de afinidad. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, pueden seleccionarse linfocitos T específicos de antígeno, tal como mediante cribado para evaluar la actividad de CTL contra el péptido. En algunas divulgaciones, los TCR, por ejemplo, presentes en los linfocitos T específicas de antígeno, pueden seleccionarse, tal como mediante actividad de unión, por ejemplo, afinidad o avidéz particular por el antígeno.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el TCR o la porción de unión a antígeno del mismo es uno que se ha modificado o modificado por ingeniería genética. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, se usan métodos de evolución dirigida para generar TCR con propiedades alteradas, tal como con mayor afinidad por un complejo MHC-péptido específico. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la evolución dirigida se consigue mediante métodos de presentación que incluyen, pero sin limitación, presentación en levadura (Holler *et al.* (2003) *Nat Immunol*, 4, 55-62; Holler *et al.* (2000) *Proc Natl Acad Sci USA*, 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 que se divulgan en el presente documento, los enfoques de presentación implican modificación por ingeniería genética, o modificar, un TCR conocido, parental o de referencia. Por ejemplo, en algunos casos que se divulgan en el presente documento, puede usarse un TCR de tipo silvestre como molde para producir TCR mutagenizados en los que uno o más restos 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 que se divulgan en el presente documento, los péptidos de un polipéptido diana para su uso en la producción o generación de un TCR de interés son conocidos o pueden identificarse fácilmente. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los péptidos adecuados para su uso en la generación de TCR o porciones de unión a antígeno pueden determinarse basándose en la presencia de un motivo restringido por HLA en un polipéptido diana de interés, tal como un polipéptido diana que se describe a continuación. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los péptidos se identifican usando modelos de predicción informáticos disponibles. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, para predecir sitios de unión de 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 que se divulgan en el presente documento, el epítipo restringido por MHC es HLA-A0201, que se expresa en aproximadamente el 39-46 % de todas las personas caucásicas y, por lo tanto, representa una elección adecuada de antígeno de MHC para su uso en la preparación de un TCR u otra molécula de unión a MHC-péptido.

Se conocen motivos de unión a HLA-A0201 y los sitios de escisión para proteasomas e inmunoproteasomas usando modelos de predicción por ordenador. Para predecir sitios de unión de MHC de clase I, dichos modelos incluyen, pero sin limitación, ProPred1 (que se describe con más detalle en Singh y Raghava, *ProPred: prediction of HLA-DR binding sites*. *BIOINFORMATICS* 17(12): 1236-1237 2001) y SYFPEITHI (véase Schuler *et al.* *SYFPEITHI, Database for Searching and T-Cell Epitope Prediction* en *Immunoinformatics Methods in Molecular Biology*, vol 409(1): 75-93 2007).

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el TCR o la porción de unión a antígeno del mismo puede ser una proteína natural producida de forma recombinante o una forma mutada del mismo en la que una o más propiedades, tales como la característica de unión, se han alterado. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, un TCR puede derivar de una de diversas especies animales, tales como ser humano, ratón, rata u otro mamífero. Un TCR puede estar unido a células o en forma soluble. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, para los fines de los métodos que se divulgan, el TCR está en forma unida a la célula expresada en la superficie de una célula.

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

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

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, un dTCR contiene un primer polipéptido en donde una

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

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, un dTCR contiene una cadena α de TCR 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 los motivos de dimerización primero y segundo interactúan fácilmente para formar un enlace covalente entre un aminoácido en el primer motivo de dimerización y un aminoácido en el segundo motivo de dimerización que une la cadena α de TCR y la cadena β de TCR entre sí.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el TCR es un scTCR. Normalmente, puede generarse un scTCR usando métodos conocidos, Véase, por ejemplo, Soo Hoo, W. F. *et al.* PNAS (EE.UU.) 89, 4759 (1992); Wülfing, C. y Plückerthun, A., *J. Mol. Biol.* 242, 655 (1994); Kurucz, I. *et al.* PNAS (EE.UU.) 90 3830 (1993); PCT publicada internacional 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 que se divulgan en el presente documento, un scTCR contiene un enlace intercatenario disulfuro no nativo introducido para facilitar la asociación de las cadenas de TCR (véase, por ejemplo, la PCT Internacional N.º WO 03/020763). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, un scTCR es un TCR truncado no unido por disulfuro en el que las cremalleras de leucina heterólogas fusionadas con los extremos C del mismo facilitan la asociación de cadenas (véase, por ejemplo, la PCT Internacional N.º WO99/60120). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, un scTCR contiene un dominio variable de TCR α unido covalentemente a un dominio variable de TCR β a través de un enlazador peptídico (véase, por ejemplo, la PCT Internacional N.º WO99/18129).

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

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

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el enlazador de un scTCR que une los segmentos primero y segundo de TCR puede ser cualquier enlazador capaz de formar una única cadena polipeptídica, conservando al mismo tiempo la especificidad de unión a TCR. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la secuencia enlazadora puede tener, por ejemplo, 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 que se divulgan en el presente documento, los segmentos primero y segundo están emparejados de manera que las secuencias de región variable de los mismos estén orientadas para dicha unión. Por lo tanto, en algunos casos que se divulgan en el presente documento, el enlazador tiene una longitud suficiente para abarcar la distancia entre el extremo C del primer segmento y el extremo N del segundo segmento, o viceversa, pero no es demasiado largo para bloquear o reducir la unión del scTCR al ligando diana. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el enlazador puede contener desde o de aproximadamente 10 a 45 aminoácidos, tal como de 10 a 30 aminoácidos o de 26 a 41 restos de aminoácidos, por ejemplo, 29, 30, 31 o 32 aminoácidos. En algunos casos que se divulgan 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 que se divulgan en el presente documento, el enlazador tiene la secuencia GSADDAKKDAKKDGKS (SEQ ID NO: 29)

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el scTCR contiene un enlace disulfuro covalente que une un resto de la región de inmunoglobulina del dominio constante de la cadena α a un resto de la región de inmunoglobulina del dominio constante de la cadena β . En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el enlace disulfuro intercatenario en un TCR nativo no está presente. Por ejemplo, en algunos casos que se divulgan en el presente documento, pueden incorporarse una o más cisteínas en las secuencias extracelulares de región constante de los segmentos primero y segundo del polipéptido de scTCR. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, puede ser deseable tanto un enlace disulfuro nativo como no nativo.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento de un dTCR o scTCR que contiene enlaces disulfuro intercatenarios introducidos, los enlaces disulfuro nativos no están presentes. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la una o más de las cisteínas nativas que forman un enlace disulfuro intercatenario nativo se sustituyen por otro resto, tal como por una serina o alanina. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, puede formarse un enlace disulfuro introducido mediante la mutación de restos no de cisteína en los segmentos primero y segundo a cisteína. Se describen enlaces disulfuro no nativos de ejemplo de un TCR en la PCT Internacional publicada N.º WO2006/000830.

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

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el ácido nucleico o ácidos nucleicos que codifican un TCR, tal como cadenas α y β , puede amplificarse mediante PCR, clonación u otros medios adecuados y clonados en un vector o vectores de expresión adecuados. El vector de expresión puede ser cualquier vector de expresión recombinante adecuado y puede usarse para transformar o transfectar cualquier hospedador adecuado. Los vectores adecuados incluyen aquellos diseñados para propagación y expansión o para expresión o ambas cosas, tales como plásmidos y virus.

En algunos casos que se divulgan 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 que se divulgan en el presente documento, también pueden usarse vectores de bacteriófagos, tales como λ G10, λ GT11, λ ZapII (Stratagene), λ EMBL4 y λ NM1149. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, pueden usarse vectores de expresión de plantas e incluyen pBI01, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 y pBIN19 (Clontech). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los vectores de expresión de animales incluyen pEUK-CI, pMAM y pMAMneo (Clontech). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, se usa un vector vírico, tal como un vector retrovírico.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los vectores de expresión recombinantes pueden prepararse usando técnicas de ADN recombinante convencionales. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los vectores pueden contener secuencias reguladoras, tales como codones de inicio y terminación de transcripción y traducción, que son específicos del tipo de hospedador (por ejemplo, bacteria, hongo, planta o animal) en el que se ha de introducir el vector, según sea adecuado y teniendo en cuenta si el vector se basa en ADN o ARN. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el vector puede contener un promotor no nativo unido operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica el TCR o la porción de unión a antígeno (u otra molécula de unión a MHC-péptido). En algunos casos que se divulgan 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 de RSV y un promotor que se encuentra en la repetición terminal larga del virus de células madre murinas. También se contemplan otros promotores conocidos.

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

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos que se divulgan implican administrar a un sujeto que tiene una enfermedad o afección células que expresan un receptor de antígeno recombinante. Se conocen bien diversos métodos para la introducción de componentes modificados genéticamente, por ejemplo, receptores recombinantes, por ejemplo, CAR o TCR, y pueden usarse con los métodos y composiciones que se divulgan. Los

métodos de ejemplo incluyen aquellos para la transferencia de ácidos nucleicos que codifican los receptores, incluso a través transducción vírica, por ejemplo, retrovírica o lentivírica, transposones y electroporación.

Entre las células que expresan los receptores y que se administran mediante los métodos que se divulgan se encuentran las células modificadas por ingeniería genética. La modificación por ingeniería genética generalmente implica la introducción de un ácido nucleico que codifica el componente recombinante o modificado por ingeniería genética en una composición que contiene las células, tal como mediante transducción, transfección o transformación retrovírica.

C. Receptores de autoanticuerpos quiméricos (CAAR)

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, entre el receptor recombinante expresado por las células modificadas por ingeniería genética utilizado en relación con los métodos, usos, artículos de fabricación y composiciones transducción se encuentra un receptor de autoanticuerpo quimérico (CAAR). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el CAAR es específico para un autoanticuerpo. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, una célula que expresa el CAAR, tal como un linfocito T modificado por ingeniería genética para expresar un CAAR, puede usarse para unirse específicamente y destruir células que expresan autoanticuerpos, pero no células normales que expresan anticuerpos. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, pueden usarse células que expresan CAAR para tratar una enfermedad autoinmunitaria asociada a la expresión de autoantígenos, tal como enfermedades autoinmunitarias. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células que expresan CAAR pueden dirigirse a linfocitos B que en última instancia producen los autoanticuerpos y presentan los autoanticuerpos en sus superficies celulares, marcando estos linfocitos B como dianas específicas de la enfermedad para la intervención terapéutica. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, pueden usarse células que expresan CAAR para dirigirse de manera eficiente y destruir los linfocitos B patógenos en enfermedades autoinmunitarias dirigiéndose a los linfocitos B que provocan la enfermedad usando un receptor de autoanticuerpo quimérico específico de antígeno. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el receptor recombinante es un CAAR, tal como cualquiera que se describe en la Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. N.º US 2017/0051035.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el CAAR comprende un dominio de unión de a autoanticuerpo, un dominio transmembrana y una región de señalización intracelular. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la región de señalización intracelular comprende un dominio de señalización intracelular. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el dominio de señalización intracelular es o comprende un dominio de señalización primaria, 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 receptor de linfocitos T (TCR) y/o un dominio de señalización que comprende un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptor (ITAM). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la región de señalización intracelular comprende una región de señalización secundaria o coestimuladora (regiones de señalización intracelular secundaria).

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el dominio de unión de autoanticuerpo comprende un autoantígeno o un fragmento del mismo. La elección del autoantígeno puede depender del tipo de autoanticuerpo al que se dirige. Por ejemplo, el autoantígeno puede elegirse porque reconoce un autoanticuerpo en una célula diana, tal como un linfocito B, asociado a una patología particular, por ejemplo, una enfermedad autoinmunitaria, tal como una enfermedad autoinmunitaria mediada por autoanticuerpos. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la enfermedad autoinmunitaria incluye pénfigo vulgar (PV). Los autoantígenos de ejemplo incluyen desmogleína 1 (Dsg1) y Dsg3.

D. Direccionamiento múltiple

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células utilizadas en relación con los métodos, usos, artículos de fabricación y composiciones que se divulgan incluyen células que emplean estrategias de direccionamiento múltiple, tales como la expresión de dos o más receptores modificados genéticamente en la célula, reconociendo cada uno el mismo antígeno o uno diferente y normalmente incluyendo cada uno un componente de señalización intracelular diferente. Dichas estrategias de direccionamiento múltiple se describen, por ejemplo, en la Solicitud de Patente Internacional, Publicación N.º: WO 2014055668 A1 (que describe combinaciones de CAR activadores y coestimuladores, por ejemplo, que se dirigen a dos antígenos diferentes presentes individualmente fuera de la diana, por ejemplo, células normales, pero presentes juntos solamente en las células de la enfermedad o afección que ha de tratarse) y Fedorov *et al.*, *Sci. Transl. Medicine*, 5(215) (2013) (que describen células que expresan un CAR activador y uno inhibidor, tales como aquellas en las que el CAR activador se une a un antígeno expresado tanto en células normales o no enfermas como en células de la enfermedad o afección que ha de tratarse, y el CAR inhibidor se une a otro antígeno expresado solamente en las células normales o células que no se desean tratar).

Por ejemplo, en algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células incluyen un receptor que expresa un primer receptor de antígeno modificado genéticamente (por ejemplo, CAR o TCR) que es capaz de inducir una señal activadora o estimulación a la célula, generalmente tras la unión específica al antígeno reconocido por el primer receptor, por ejemplo, el primer antígeno. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la célula

incluye además un segundo receptor de antígeno modificado genéticamente (por ejemplo, CAR o TCR), por ejemplo, un receptor coestimulador quimérico, que es capaz de inducir una señal coestimuladora a la célula inmunitaria, generalmente tras la unión específica a un segundo antígeno reconocido por el segundo receptor. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el primer antígeno y el segundo antígeno son iguales. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el primer antígeno y el segundo antígeno son diferentes.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el primer y/o el segundo receptor de antígeno modificado genéticamente (por ejemplo, CAR o TCR) son capaces de inducir una señal activadora a la célula. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el receptor incluye un componente de señalización intracelular que contiene ITAM o motivos similares a ITAM. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la activación inducida por el primer receptor implica una transducción de señales o un cambio en la expresión de proteínas en la célula que da como resultado el inicio de una respuesta inmunitaria, tal como la fosforilación de ITAM y/o el inicio de la cascada de transducción de señales mediada por ITAM, la formación de una sinapsis inmunitaria y/o la agrupación de moléculas cerca del receptor unido (por ejemplo, CD4 o CD8, etc.), la activación de uno o más factores de transcripción, tales como NF- κ B y/o AP-1, y/o la inducción de la expresión génica de factores tales como citocinas, la proliferación y/o la supervivencia.

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

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el primer y/o el segundo receptor incluyen tanto un dominio de señalización intracelular que contiene ITAM o motivos similares a ITAM como un dominio de señalización intracelular de un receptor coestimulador.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el primer receptor contiene un dominio de señalización intracelular que contiene ITAM o motivos similares a ITAM y el segundo receptor contiene un dominio de señalización intracelular de un receptor coestimulador. La señal coestimuladora en combinación con la señal activadora inducida en la misma célula es una que da como resultado una respuesta inmunitaria, tal como una respuesta inmunitaria robusta y sostenida, tal como el aumento de la expresión génica, la secreción de citocinas y otros factores, y funciones efectoras mediadas por linfocitos T tales como la destrucción celular.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, ni la ligadura del primer receptor solo ni la ligadura del segundo receptor solo inducen una respuesta inmunitaria robusta. En algunas divulgaciones, si solo se liga un receptor, la célula se vuelve tolerante o no responde al antígeno, o se inhibe, y/o no se induce a proliferar o secretar factores o realizar funciones efectoras. En algunos de dichos casos que se divulgan en el presente documento, sin embargo, cuando se liga la pluralidad de receptores, tal como tras el encuentro de una célula que expresa los antígenos primero y segundo, se consigue una respuesta deseada, tal como la activación o estimulación inmunitaria completa, por ejemplo, como se indica por la secreción de una o más citocinas, la proliferación, la persistencia y/o la realización de una función efectora inmunitaria tal como la destrucción citotóxica de una célula diana.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los dos receptores inducen, respectivamente, una señal activadora y una inhibidora a la célula, de manera que la unión de uno de los receptores a su antígeno activa la célula o induce una respuesta, pero la unión por el segundo receptor inhibidor a su antígeno induce una señal que suprime o amortigua esa respuesta. Son ejemplos las combinaciones de CAR activadores y CAR inhibidores o iCAR. Puede usarse una estrategia de este tipo, por ejemplo, en la que el CAR activador se une a un antígeno expresado en una enfermedad o afección, pero que también se expresa en células normales, y el receptor inhibidor se une a un antígeno separado que se expresa en las células normales, pero no en las células de la enfermedad o afección.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la estrategia de direccionamiento múltiple se emplea en un caso en el que un antígeno asociado a una enfermedad o afección particular se expresa en una célula no enferma y/o se expresa en la propia célula modificada por ingeniería genética, ya sea transitoriamente (por ejemplo, tras la estimulación en asociación con modificación genética) o permanentemente. En dichos casos que se divulgan en el presente documento, al requerir la ligadura de dos receptores de antígenos separados e individualmente específicos, la especificidad, la selectividad y/o la eficacia pueden mejorar.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la pluralidad de antígenos, por ejemplo, los antígenos primero y segundo, se expresan en la célula, tejido o enfermedad o afección a la que se dirigen, tal como en la célula cancerosa. En algunas divulgaciones, la célula, tejido, enfermedad o afección es mieloma múltiple o una célula de mieloma múltiple. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, uno o más de la pluralidad de antígenos generalmente también se expresan en una célula a la que no se desea dirigirse con la terapia celular, tal como una célula o tejido normal o no enfermo, y/o las propias células modificadas por ingeniería genética. En dichos casos que se divulgan en el presente documento, al requerir la ligadura de múltiples receptores para conseguir una

respuesta de la célula, se consigue especificidad y/o eficacia.

IV. MÉTODOS DE MODIFICACIÓN POR INGENIERÍA GENÉTICA DE CÉLULAS

En casos particulares que se divulgan en el presente documento, las células modificadas por ingeniería genética se producen mediante un proceso que genera una composición de salida de linfocitos T enriquecidos a partir de una o más composiciones de entrada y/o a partir de una única muestra biológica. En determinados casos que se divulgan en el presente documento, la composición de salida contiene células que expresan un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR, tal como un CAR anti-CD 19. En casos particulares que se divulgan en el presente documento, las células de las composiciones de salida son adecuadas para su administración a un sujeto como terapia, por ejemplo, una terapia celular autóloga. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la composición de salida es una composición de linfocitos T CD4+ o CD8+ enriquecidos.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el proceso para generar o producir células modificadas por ingeniería genética es mediante un proceso que incluye algunas o todas las etapas de: recoger u obtener una muestra biológica; aislar, seleccionar o enriquecer células de entrada de la muestra biológica; crioconservar y almacenar las células de entrada; descongelar y/o incubar las células de entrada en condiciones estimuladoras; modificar por ingeniería genética las células estimuladas para expresar o contener un polinucleótido recombinante, por ejemplo, un polinucleótido que codifica un receptor recombinante tal como un CAR; cultivar las células modificadas por ingeniería genética, por ejemplo, a una cantidad, densidad o expansión umbral; formular las células cultivadas en una composición de salida; y/o crioconservar y almacenar las células de salida formuladas hasta que las células se liberen para la infusión y/o sean adecuadas para administrarse a un sujeto. En determinados casos que se divulgan en el presente documento, el proceso se realiza con dos o más composiciones de entrada de linfocitos T enriquecidos, tales como una composición de CD4+ separada y una composición de CD8+ separada, que se procesan y se modifican por ingeniería genética por separado a partir de la misma muestra biológica de partida o inicial y se reinfunden de nuevo en el sujeto en una relación definida, por ejemplo, relación 1:1 de linfocitos T CD4+ a CD8+. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los linfocitos T enriquecidos son o incluyen linfocitos T modificados por ingeniería genética, por ejemplo, linfocitos T transducidos para expresar un receptor recombinante.

En casos particulares que se divulgan en el presente documento, se produce una composición de salida de células modificadas por ingeniería genética que expresan un receptor recombinante (por ejemplo, CAR anti-CD 19) a partir de una composición inicial y/o de entrada de células. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la composición de entrada es una composición de linfocitos T enriquecidos, linfocitos T CD4+ enriquecidos y/o linfocitos T CD8+ enriquecidos (en lo sucesivo en el presente documento también denominadas composiciones de linfocitos T enriquecidos, composiciones de linfocitos T CD4+ enriquecidos y composiciones de linfocitos T CD8+ enriquecidos, respectivamente). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosis de linfocitos T modificados por ingeniería genética empleados en los casos que se divulgan en el presente documento, para la administración a un sujeto, está enriquecida para linfocitos T CD4+ o CD8+. En algunas divulgaciones, el enriquecimiento se compara con la cantidad o porcentaje de células CD4+ o CD8+ que están presentes en la composición de entrada y/o una única muestra biológica, tal como una muestra obtenida del sujeto. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, una composición enriquecida en linfocitos T CD4+ contiene al menos un 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 99,9 % de linfocitos T CD4+. En casos particulares que se divulgan en el presente documento, la composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos contiene un 100 % de linfocitos T CD4+ y contiene aproximadamente un 100 % de linfocitos T CD4+. En determinados casos que se divulgan en el presente documento, la composición de linfocitos T enriquecidos incluye o contiene menos del 20 %, menos del 10 %, menos del 5 %, menos del 1 %, menos del 0,1 % o menos del 0,01 % de linfocitos T CD8+, y/o no contiene linfocitos T CD8+, y/o está libre o sustancialmente libre de linfocitos T CD8+. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las poblaciones de células consisten esencialmente en linfocitos T CD4+. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, una composición enriquecida en linfocitos T CD8+ contiene al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 99,9 % de linfocitos T CD8+, o contiene o contiene aproximadamente el 100 % de linfocitos T CD8+. En determinados casos que se divulgan en el presente documento, la composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos incluye o contiene menos del 20 %, menos del 10 %, menos del 5 %, menos del 1 %, menos del 0,1 % o menos del 0,01 % de linfocitos T CD4+, y/o no contiene linfocitos T CD4+, y/o está libre o sustancialmente libre de linfocitos T CD4+. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las poblaciones de células consisten esencialmente en linfocitos T CD8+.

En determinados casos que se divulgan en el presente documento, el proceso para producir células modificadas por ingeniería genética puede incluir además uno o más de: activar y/o estimular células, por ejemplo, células de una composición de entrada; modificar genéticamente las células activadas y/o estimuladas, por ejemplo, para introducir un polinucleótido que codifica una proteína recombinante por transducción o transfección; y/o cultivar las células modificadas por ingeniería genética, por ejemplo, en condiciones que promueven la proliferación y/o expansión. En casos particulares que se divulgan en el presente documento, los métodos que se divulgan pueden usarse en relación con la recolección, recogida y/o formulación de composiciones de salida producidas después de que las células se hayan incubado, activado, estimulado, modificado por ingeniería genética, transducido, transfectado y/o cultivado.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células modificadas por ingeniería genética, tales

como aquellas que expresan un CAR anti-CD19 como se describe, utilizadas de acuerdo con los métodos que se divulgan se producen o generan mediante un proceso para seleccionar, aislar, activar, estimular, expandir, cultivar y/o formular células. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, dichos métodos incluyen cualquiera de los que se describen.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células modificadas por ingeniería genética, tales como aquellas que expresan un CAR anti-CD 19 como se describe, utilizadas de acuerdo con los métodos y usos que se divulgan se producen o generan mediante un proceso para seleccionar, aislar, activar, estimular, expandir, cultivar y/o formular células. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, dichos métodos incluyen cualquiera de los que se describen.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células modificadas por ingeniería genética, tales como aquellas que expresan un CAR anti-CD 19 como se describe, utilizadas de acuerdo con los métodos y usos que se divulgan, se producen o generan mediante procesos de ejemplo como se describe en, por ejemplo, los documentos WO 2019/089855 y WO 2015/164675.

En algunos de cualesquier casos que se divulgan en el presente documento, los procesos de ejemplo para generar, producir o fabricar las células modificadas por ingeniería genética, tales como aquellas que expresan un CAR anti-CD 19 como se describe, o una composición que comprende dichas células, tal como una composición que comprende linfocitos T CD4+ modificados por ingeniería genética y linfocitos T CD8+ modificados por ingeniería genética, expresando cada uno el mismo receptor de antígeno quimérico (CAR) anti-CD19, implican someter poblaciones de células CD4+ enriquecidas y CD8+ enriquecidas, por separado, a etapas de proceso. En algunas divulgaciones del proceso de ejemplo para generar o fabricar células modificadas por ingeniería genética, las células CD4+ y CD8+ se seleccionan por separado de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC, por sus siglas en inglés), por ejemplo, que se obtienen por leucoféresis, generando composiciones de células CD4+ enriquecidas y CD8+ enriquecidas separadas. En algunas divulgaciones, dichas células pueden crioconservarse. En algunas divulgaciones, las composiciones de CD4+ y CD8+ pueden descongelarse posteriormente y someterse por separado a etapas de estimulación, transducción y expansión.

En algunas divulgaciones del proceso de ejemplo para generar o fabricar células modificadas por ingeniería genética, las células CD4+ y CD8+ descongeladas se estimulan por separado, por ejemplo, en presencia de perlas recubiertas de poliestireno paramagnéticas acopladas a anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (tal como en una relación de perlas a células 1:1). En algunas divulgaciones, la estimulación se realiza en medios que contienen IL-2 recombinante humana, IL-15 recombinante humana y N-acetilcisteína (NAC). En algunas divulgaciones, los medios de cultivo celular para células CD4+ también pueden incluir IL-7 recombinante humana.

En algunas divulgaciones del proceso de ejemplo para generar o fabricar células modificadas por ingeniería genética, después de la introducción de las perlas, las células CD4+ y CD8+ se transducen por separado con un vector lentivírico que codifica el mismo CAR, tal como el mismo CAR anti-CD 19. En algunas divulgaciones, el CAR puede contener un scFv anti-CD 19 derivado de un anticuerpo murino, un espaciador de inmunoglobulina, un dominio transmembranario derivado de CD28, una región coestimuladora derivada de 4-1BB y un dominio de señalización intracelular de CD3-zeta. En algunas divulgaciones, el vector puede codificar un receptor truncado que sirve como marcador sustituto para la expresión de CAR que está conectado a la construcción de CAR por una secuencia T2A. En algunas divulgaciones del proceso ilustrativo, las células se transducen en presencia de sulfato de protamina 10 µg/ml.

En algunas divulgaciones del proceso de ejemplo para generar o fabricar células modificadas por ingeniería genética, después de la transducción, las perlas se retiran de las composiciones celulares mediante la exposición a un campo magnético. En algunas divulgaciones, las composiciones de células CD4+ y CD8+ se cultivan por separado para su expansión con mezcla continua y transferencia de oxígeno mediante un biorreactor (por ejemplo, un biorreactor Xuri W25). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, se añade poloxámero al medio. En algunas divulgaciones, las composiciones de células tanto CD4+ como CD8+ se cultivan en presencia de IL-2 e IL-15. En algunas divulgaciones, el medio de células CD4+ también incluía IL-7. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células CD4+ y CD8+ se cultivan cada una, antes de la recogida, a una expansión cuádruple. En algunas divulgaciones, un día después de alcanzar el umbral, las células de cada composición pueden recogerse, formularse y crioconservarse por separado. En algunas divulgaciones, los procesos de ejemplo para generar, producir o fabricar las células modificadas por ingeniería genética, tales como aquellas que expresan un CAR anti-CD 19 como se describe, o una composición que comprende dichas células, tal como una composición que comprende linfocitos T CD4+ modificados por ingeniería genética y linfocitos T CD8+ modificados por ingeniería genética, expresando cada uno el mismo receptor de antígeno quimérico (CAR) anti-CD19, incluyen aquellos que se describen en la Tabla 11 a continuación.

Tabla 11: Proceso de ejemplo para generar linfocitos T-CAR CD4+ y CD8+

Fase	Células CD4+	Células CD8+
Estimulación (día 1-2)	• perlas conjugadas con anticuerpo anti-CD3/CD28 • relación de perla a célula 1:1	• perlas conjugadas con anticuerpo anti-CD3/CD28 • relación de perla a célula 1:1

	• medio: IL-2, IL-7, IL-15 y NAC	• medio: IL-2, IL-15 y NAC
Transducción (día 2-5)	• adyuvante de transducción (por ejemplo, sulfato de protamina 10 µg/ml) • retirada de perlas magnéticas	• adyuvante de transducción (por ejemplo, sulfato de protamina 10 µg/ml) • retirada de perlas magnéticas
Retirada de perlas (día 5*)		
Expansión (día 5* - Recogida)	• biorreactor de movimiento oscilante y/o mezcla continua • medio: IL-2, IL-7, IL15 y poloxámero	• biorreactor de movimiento oscilante y/o mezcla continua • medio: IL-2, IL15 y poloxámero
*Aproximado		

En otras divulgaciones, un proceso de ejemplo diferente para generar, producir o fabricar las células modificadas por ingeniería genética o una composición que comprende dichas células incluye un proceso que difiere del proceso de ejemplo anterior en que: no se añade NAC al medio durante la estimulación; el medio de células CD4+ no contiene IL-2; las células se estimulan en una relación de perla a célula de 3:1; las células se transducen con una concentración mayor de sulfato de protamina; la retirada de perlas se produce aproximadamente el día 7; y la expansión se realiza en un ajuste estático, es decir, sin mezcla o perfusión continua (por ejemplo, perfusión semicontinua y/o por etapas) y sin poloxámero.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, al menos una composición separada de linfocitos T CD4+ enriquecidos y al menos una composición separada de linfocitos T CD8+ enriquecidos se aíslan, seleccionan, enriquecen u obtienen a partir de una única muestra biológica, por ejemplo, una muestra de PBMC u otros leucocitos del mismo donante, tal como un paciente o individuo sano. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, se originó una composición separada de linfocitos T CD4+ enriquecidos y una composición separada de linfocitos T CD8+ enriquecidos, por ejemplo, inicialmente se aislaron, seleccionaron y/o enriquecieron, a partir de la misma muestra biológica, tal como una única muestra biológica obtenida, recogida y/o tomada de un único sujeto. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, una muestra biológica se somete en primer lugar a la selección de linfocitos T CD4+, donde quedan retenidas tanto las fracciones negativas como las positivas, y la fracción negativa se somete adicionalmente a la selección de linfocitos T CD8+. En otros casos que se divulgan en el presente documento, una muestra biológica se somete en primer lugar a la selección de linfocitos T CD8+, donde quedan retenidas tanto las fracciones negativas como las positivas, y la fracción negativa se somete adicionalmente a la selección de linfocitos T CD4+. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, se realizan métodos de selección como se describe en la Publicación PCT Internacional N.º WO2015/164675. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, se realizan métodos de selección como se describe en la Publicación PCT Internacional N.º WO 2019/089855. En algunas divulgaciones, una muestra biológica se selecciona positivamente en primer lugar para que los linfocitos T CD8+ generen al menos una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos, y después la fracción negativa se selecciona positivamente para que los linfocitos T CD4+ generen al menos una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos, de manera que la al menos una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos y la al menos una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos sean composiciones separadas de la misma muestra biológica, por ejemplo, del mismo paciente donante o individuo sano. En algunas divulgaciones, dos o más composiciones separadas de linfocitos T enriquecidos, por ejemplo, una siendo al menos una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos y una siendo al menos una composición separada de linfocitos T CD8+ enriquecidos del mismo donante, se congelan por separado, por ejemplo, se crioprotegen o se crioconservan en un medio de crioconservación.

En algunas divulgaciones, dos o más composiciones separadas de linfocitos T enriquecidos, por ejemplo, una siendo al menos una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos y una siendo al menos una composición separada de linfocitos T CD8+ enriquecidos de la misma muestra biológica, se activan y/o estimulan por contacto con un reactivo estimulador (por ejemplo, mediante incubación con perlas magnéticas conjugadas anti-CD3/anti-CD28 para la activación de linfocitos T). En algunas divulgaciones, cada una de las composiciones celulares activadas/estimuladas se modifica por ingeniería genética, se transduce y/o se transfecta, por ejemplo, usando un vector vírico que codifica una proteína recombinante (por ejemplo, CAR), para expresar la misma proteína recombinante en los linfocitos T CD4+ y los linfocitos T CD8+ de cada composición celular. En algunas divulgaciones, el método comprende retirar el reactivo estimulador, por ejemplo, perlas magnéticas, de la composición celular. En algunas divulgaciones, una composición celular que contiene linfocitos T CD4+ modificados por ingeniería genética y una composición celular que contiene linfocitos T CD8+ modificados por ingeniería genética se cultivan por separado, por ejemplo, para la expansión separada de las poblaciones de linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ en las mismas. En determinados casos que se divulgan en el presente documento, se cosecha y/o se recoge y/o se formula una composición celular a partir del cultivo, por ejemplo, lavando la composición celular en un tampón de formulación. En determinados casos que se divulgan en el presente documento, una composición celular formulada que comprende linfocitos T CD4+ y una composición celular formulada que comprende linfocitos T CD8+ se congela, por ejemplo, se crioprotege o se crioconserva en un medio de crioconservación. En algunas divulgaciones, los linfocitos T CD4+ modificados por ingeniería genética y los linfocitos T CD8+ modificados por ingeniería genética en cada formulación se originan a partir del mismo donante o muestra biológica y expresan la misma proteína de recombinación (por ejemplo, CAR, tal como CAR anti-CD19). En algunas divulgaciones, una formulación de CD4+ modificada por ingeniería genética separada y

una formulación de CD8+ modificada por ingeniería genética separada se administran en una relación definida, por ejemplo, 1:1, a un sujeto que lo necesite, tal como el mismo donante.

A. Células y preparación de células para modificación por ingeniería genética

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células, tales como linfocitos T, utilizadas en relación con los métodos, usos, artículos de fabricación o composiciones que se divulgan son células que se han modificado genéticamente para expresar un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR o un TCR que se describen en el presente documento. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células modificadas por ingeniería genética se usan en el contexto de la terapia celular, por ejemplo, la terapia celular adoptiva. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células modificadas por ingeniería genética son células inmunitarias. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células modificadas por ingeniería genética son linfocitos T, tales como linfocitos T CD4+ o CD8+.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los ácidos nucleicos, tales como ácidos nucleicos que codifican un receptor recombinante, 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 modificando por ingeniería genética y/o en un organismo del que deriva dicha célula. En algunos casos que se divulgan 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 celulares diferentes.

Las células generalmente son células eucariotas, tales como células de mamífero, y normalmente son células humanas. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células derivan de la sangre, médula ósea, linfa u órganos linfoides, son células del sistema inmunitario, tales como células de la inmunidad innata o adaptativa, por ejemplo, células mieloides o linfoides, incluyendo linfocitos, normalmente linfocitos T y/o linfocitos NK. Otras células de ejemplo incluyen células madre, tales como células madre multipotentes y pluripotentes, incluyendo células madre pluripotentes inducidas (iPSC, por sus siglas en inglés). Las células normalmente son células primarias, tales como aquellas aisladas directamente de un sujeto y/o aisladas de un sujeto y congeladas. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células incluyen uno o más subconjuntos de linfocitos T u otros tipos celulares, tales como poblaciones completas de linfocitos T, células CD4+, células CD8+ y subpoblaciones de las mismas, tales como aquellas definidas por función, estado de activación, madurez, potencial de diferenciación, expansión, recirculación, ubicación y/o capacidades de persistencia, especificidad de antígeno, tipo de receptor de antígeno, presencia en un órgano o compartimento particular, marcador o perfil de secreción de citocinas y/o grado de diferenciación. Con referencia al sujeto que se ha de tratar, las células pueden ser alogénas y/o autólogas. Entre los métodos se incluyen métodos listos para usar. En algunas divulgaciones, tales como para tecnologías listas para usar, las células son pluripotentes y/o multipotentes, tales como células madre, tales como células madre pluripotentes inducidas (iPSC). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos incluyen aislar células del sujeto, preparar, procesar, cultivar y/o modificar por ingeniería genética las mismas, y reintroducirlas en el mismo sujeto, antes o después de la crioconservación.

Entre los subtipos y subpoblaciones de linfocitos T y/o de CD4+ y/o de CD8+ hay linfocitos T sin activación previa (T_N), linfocitos T efectores (T_{EFF}), linfocitos T de memoria y subtipos de los mismos, tales como linfocitos T de memoria de células madre (T_{SCM}), T de memoria central (T_{CM}), T de memoria efectora (T_{EM}) o linfocitos T de memoria efectores diferenciados terminalmente, linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), linfocitos T inmaduros, linfocitos T maduros, linfocitos T auxiliares, linfocitos T citotóxicos, linfocitos T invariantes asociadas a la mucosa (MAIT), linfocitos T reguladores (Treg) de origen natural y adaptativos, 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 que se divulgan en el presente documento, las células son linfocitos citolíticos naturales (NK, por sus siglas en inglés). En algunos casos que se divulgan 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 que se divulgan en el presente documento, las células incluyen uno o más ácidos nucleicos introducidos a través de ingeniería genética y, por lo tanto, expresan productos recombinantes o modificados genéticamente de dichos ácidos nucleicos. En algunos casos que se divulgan 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 modificando por ingeniería genética y/o en un organismo del que deriva dicha célula. En algunos casos que se divulgan 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 celulares diferentes.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la preparación de las células modificadas por ingeniería

genética incluye una o más etapas de cultivo y/o preparación. Las células para la introducción del ácido nucleico que codifica el receptor transgénico tal como el CAR, pueden aislarse de una muestra, tal como una muestra biológica, por ejemplo, una obtenida de o derivada de un sujeto. En algunos casos que se divulgan 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, el sujeto que se divulga en el presente documento 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 modifican por ingeniería genética.

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

En algunas divulgaciones, la muestra de la que derivan o se aíslan las células es sangre o una muestra derivada de sangre, o es o deriva de un producto de aféresis o leucoféresis. Los ejemplos de muestras incluyen sangre entera, células mononucleares de sangre periférica (PBMC, leucocitos, médula ósea, timo, biopsia de tejido, tumor, leucemia, linfoma, ganglio linfático, tejido linfóide asociado al intestino, tejido linfóide asociado a la mucosa, bazo, otros tejidos linfoides, hígado, pulmón, estómago, intestino, colon, riñón, páncreas, mama, hueso, próstata, cuello del útero, testículos, ovarios, amígdala u otro órgano, y/o células derivadas de los mismos. Las muestras incluyen, en el contexto de la terapia celular, por ejemplo, la terapia celular adoptiva, muestras de fuentes autólogas y alógenas.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células derivan de estirpes celulares, por ejemplo, estirpes de linfocitos T. Las células en algunos casos que se divulgan en el presente documento se obtienen a partir de una fuente xenógena, por ejemplo, de ratón, rata, primate no humano y cerdo.

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

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, se obtienen células de la sangre circulante de un sujeto, por ejemplo, por aféresis o leucoféresis. Las muestras, en algunas divulgaciones, contienen linfocitos, incluyendo linfocitos T, monocitos, granulocitos, linfocitos B, otros leucocitos nucleados, eritrocitos y/o plaquetas, y en algunas divulgaciones contienen células distintas de eritrocitos y plaquetas.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células sanguíneas recogidas del sujeto se lavan, por ejemplo, para retirar la fracción de plasma y colocar las células en un tampón o medio adecuado para las etapas de procesamiento posteriores. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células se lavan con solución salina tamponada con fosfato (PBS). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la solución de lavado carece de calcio y/o magnesio y/o muchos o todos los cationes divalentes. En algunas divulgaciones, se realiza una etapa de lavado en una centrífuga de "flujo continuo" semiautomática (por ejemplo, el procesador celular Cobe 2991, Baxter) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En algunas divulgaciones, se logra una etapa de lavado mediante filtración de flujo tangencial (TFF, por sus siglas en inglés) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células se resuspenden en una diversidad de tampones biocompatibles después del lavado, tal como, por ejemplo, PBS sin $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$. En determinados casos que se divulgan en el presente documento, se retiran los componentes de una muestra de células sanguíneas y las células se resuspenden directamente en medio de cultivo.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos incluyen métodos de separación celular basados en la densidad, tales como la preparación de leucocitos a partir de sangre periférica lisando los eritrocitos y centrifugando a través de un gradiente de Percoll o Ficoll.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, al menos una porción de la etapa de selección incluye la incubación de células con un reactivo de selección. La incubación con un reactivo o reactivos de selección, por ejemplo, como parte de los métodos de selección que pueden realizarse usando uno o más reactivos de selección para la selección de uno o más tipos celulares diferentes basándose en la expresión o presencia en o sobre 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 que se divulgan en el presente documento, puede usarse cualquier método conocido que use un reactivo o reactivos de selección para la separación basándose en

dichos marcadores. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el reactivo o reactivos de selección dan como resultado una separación que es una separación basada en afinidad o inmunoafinidad. Por ejemplo, la selección en algunas divulgaciones incluye la incubación con un reactivo o reactivos para la separación de células y poblaciones celulares basándose en la expresión de las células o el nivel de expresión de uno o más marcadores, normalmente marcadores de superficie celular, por ejemplo, mediante incubación con un anticuerpo o compañero de unión que se une específicamente a dichos marcadores, seguida generalmente por etapas de lavado y separación de células que se han unido al anticuerpo o compañero de unión, de aquellas células que no se han unido al anticuerpo o compañero de unión.

En algunas divulgaciones de dichos procesos, se mezcla un volumen de células con una cantidad de un reactivo de selección basado en afinidad deseado. La selección basada en inmunoafinidad puede realizarse usando cualquier sistema o método que dé como resultado una interacción energética favorable entre las células que se separan y la molécula que se une específicamente al marcador en la célula, por ejemplo, el anticuerpo u otro compañero de unión en la superficie sólida, por ejemplo, partícula. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos se realizan usando partículas tales como perlas, por ejemplo, perlas magnéticas, que están recubiertas con un agente de selección (por ejemplo, un anticuerpo) específico para el marcador de las células. Las partículas (por ejemplo, perlas) pueden incubarse o mezclarse con células en un recipiente, tal como un tubo o bolsa, mientras se agita o se mezcla, con una relación constante de densidad celular a partícula (por ejemplo, perla) para ayudar a promover interacciones energéticamente favorecidas. En otros casos que se divulgan en el presente documento, los métodos incluyen la selección de células en las que toda o una porción de la selección se realiza en la cavidad interna de una cámara centrífuga, por ejemplo, con rotación centrífuga. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la incubación de células con reactivos de selección, tales como reactivos de selección basados en inmunoafinidad, se realiza en una cámara centrífuga. En determinados casos que se divulgan en el presente documento, el aislamiento o separación se realiza usando un sistema, dispositivo o aparato que se describe en la Solicitud de Patente Internacional, Número de publicación WO2009/072003 o US 20110003380 A1. En un caso que se divulga en el presente documento, el sistema es un sistema como se describe en la Publicación Internacional Número WO2016/073602.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, mediante la realización de dichas etapas de selección o porciones de las mismas (por ejemplo, incubación con partículas recubiertas de anticuerpos, por ejemplo, perlas magnéticas) en la cavidad de una cámara centrífuga, el usuario es capaz de controlar determinados parámetros, tales como el volumen de diversas soluciones, la adición de solución durante el procesamiento y el momento de la misma, lo que puede proporcionar ventajas en comparación con otros métodos disponibles. Por ejemplo, la capacidad de disminuir el volumen de líquido en la cavidad durante la incubación puede aumentar la concentración de las partículas (por ejemplo, reactivo de perlas) utilizadas en la selección y, por lo tanto, el potencial químico de la solución, sin afectar al número total de células en la cavidad. Esto, a su vez, puede potenciar las interacciones por pares entre las células que se procesan y las partículas utilizadas para la selección. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, realizar la etapa de incubación en la cámara, por ejemplo, cuando se asocia a los sistemas, circuitos y control como se describen en el presente documento, permite al usuario efectuar la agitación de la solución en el momento o momentos deseados durante la incubación, lo que también puede mejorar la interacción.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, al menos una porción de la etapa de selección se realiza en una cámara centrífuga, que incluye la incubación de células con un reactivo de selección. En algunas divulgaciones de dichos procesos, un volumen de células se mezcla con una cantidad de un reactivo de selección basado en afinidad deseado que es mucho menor que el que se emplea normalmente cuando se realizan selecciones similares en un tubo o recipiente para la selección del mismo número de células y/o volumen de células de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, se emplea una cantidad de reactivo o reactivos de selección que es no más del 5 %, no más del 10 %, no más del 15 %, no más del 20 %, no más del 25 %, no más del 50 %, no más del 60 %, no más del 70 % o no más del 80 % de la cantidad del mismo reactivo o reactivos de selección empleados para la selección de células en una incubación basada en tubos o recipientes para el mismo número de células y/o el mismo volumen de células de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, para la selección, por ejemplo, la selección basada en inmunoafinidad de las células, las células se incuban en la cavidad de la cámara en una composición que también contiene el tampón de selección con un reactivo de selección, tal como una molécula que se une específicamente a un marcador de superficie en una célula que deseaba enriquecer y/o agotar, pero no en otras células de la composición, tal como un anticuerpo, que opcionalmente se acopla a un armazón tal como un polímero o superficie, por ejemplo, perla, por ejemplo, perla magnética, tales como perlas magnéticas acopladas a anticuerpos monoclonales específicos para CD4 y CD8. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, como se describe, el reactivo de selección se añade a las células en la cavidad de la cámara en una cantidad que es sustancialmente inferior (por ejemplo, no es más del 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 % u 80 % de la cantidad) en comparación con la cantidad del reactivo de selección que se usa normalmente o sería necesario para conseguir aproximadamente la misma o similar eficiencia de selección del mismo número de células o el mismo volumen de células cuando la selección se realiza en un tubo con agitación o rotación. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la incubación se realiza con la adición de un tampón de selección a las células y reactivo de selección para conseguir un volumen objetivo con la incubación del reactivo de, por ejemplo, de 10 ml a 200 ml, tal

como al menos o aproximadamente al menos 10 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml, 50 ml, 60 ml, 70 ml, 80 ml, 90 ml, 100 ml, 150 ml o 200 ml. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el tampón de selección y el reactivo de selección se premezclan antes de la adición a las células. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el tampón de selección y el reactivo de selección se añaden por separado a las células. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la incubación de selección se realiza con condiciones de mezcla periódicas suaves, lo que puede ayudar a promover interacciones energéticamente favorecidas y, por lo tanto, permitir el uso de menos reactivo de selección global mientras se consigue una alta eficiencia de selección.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la duración total de la incubación con el reactivo de selección es desde o de aproximadamente 5 minutos a 6 horas, tal como de 30 minutos a 3 horas, por ejemplo, al menos o aproximadamente al menos 30 minutos, 60 minutos, 120 minutos o 180 minutos.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la incubación se realiza generalmente en condiciones de mezcla, tal como en presencia de centrifugación, generalmente a una fuerza o velocidad relativamente baja, tal como una velocidad inferior a la utilizada para sedimentar las células, tal como desde o de aproximadamente 600 rpm a 1700 rpm (por ejemplo, exactamente o aproximadamente o al menos 600 rpm, 1000 rpm, o 1500 rpm o 1700 rpm), tal como a una RCF en la muestra o pared de la cámara u otro recipiente de desde o de aproximadamente 80 g a 100 g (por ejemplo, exactamente o aproximadamente o al menos 80 g, 85 g, 90 g, 95 g o 100 g). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la centrifugación se realiza usando intervalos repetidos de una centrifugación a dicha velocidad baja seguidos de un período de descanso, tal como una centrifugación y/o descanso durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 segundos, tal como una centrifugación a aproximadamente 1 o 2 segundos seguida de un descanso durante aproximadamente 5, 6, 7 u 8 segundos.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, dicho proceso se realiza dentro del sistema completamente cerrado del que forma parte la cámara. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, este proceso (y en algunas divulgaciones también una o más etapas adicionales, tal como una etapa de lavado anterior que lava una muestra que contiene las células, tal como una muestra de aféresis) se realiza de forma automatizada, de manera que las células, el reactivo y otros componentes se introducen y expulsan de la cámara en los momentos adecuados y se efectúa la centrifugación, para completar la etapa de lavado y unión en un único sistema cerrado usando un programa automatizado.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, después de la incubación y/o mezcla de las células y el reactivo de selección y/o los reactivos, las células incubadas se someten a una separación para seleccionar células basándose en la presencia o ausencia del reactivo o reactivos particulares. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la separación se realiza en el mismo sistema cerrado en el que se realizó la incubación de las células con el reactivo de selección. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, después de la incubación con los reactivos de selección, las células incubadas, incluyendo las células en las que se ha unido el reactivo de selección, se transfieren a un sistema para la separación basada en inmunoafinidad de las células. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el sistema para la separación basada en inmunoafinidad es o contiene una columna de separación magnética.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos de aislamiento incluyen la separación de diferentes tipos celulares 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 que se divulgan en el presente documento, puede usarse cualquier método conocido para la separación basado en dichos marcadores. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la separación es una separación basada en afinidad o inmunoafinidad. Por ejemplo, el aislamiento en algunas divulgaciones incluye la separación de células y poblaciones celulares basándose en la expresión de las células o el nivel de expresión de uno o más marcadores, normalmente marcadores de superficie celular, por ejemplo, mediante incubación con un anticuerpo o compañero de unión que se une específicamente a dichos marcadores, seguida generalmente por etapas de lavado y separación de células que se han unido al anticuerpo o compañero de unión, de aquellas células que no se han unido al anticuerpo o compañero de unión.

Dichas etapas de separación pueden basarse en una selección positiva, en la que las células que se han unido a los reactivos quedan retenidas para su uso posterior, y/o selección negativa, en la que quedan retenidas las células que no se han unido al anticuerpo o compañero de unión. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, ambas fracciones quedan retenidas para su uso posterior. En algunas divulgaciones, la selección negativa puede ser particularmente útil cuando no hay ningún anticuerpo disponible que identifique específicamente un tipo celular en una población heterogénea, de manera que la separación se realice mejor basándose en marcadores expresados por células distintas de la población deseada.

La separación no necesita dar como resultado un enriquecimiento o retirada del 100 % de una población celular particular o células que expresan un marcador particular. Por ejemplo, la selección positiva o enriquecimiento de células de un tipo particular, tales como aquellas que expresan un marcador, se refiere a aumentar el número o porcentaje de dichas células, pero no es necesario que dé como resultado una ausencia completa de células que no expresen el marcador. Análogamente, la selección negativa, retirada o agotamiento de células de un tipo particular,

tales como aquellas que expresan un marcador, se refiere a disminuir el número o porcentaje de dichas células, pero no es necesario que dé como resultado una retirada completa de todas estas células.

En algunos casos que se divulgan 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 positiva o negativa posterior. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, una única etapa de separación puede agotar las células que expresan múltiples marcadores simultáneamente, tal como incubando células con una pluralidad de anticuerpos o compañeros de unión, cada uno específico para un marcador dirigido para selección negativa. Análogamente, pueden seleccionarse positivamente simultáneamente múltiples tipos de células incubando células con una pluralidad de anticuerpos o compañeros de unión expresados en los diversos tipos celulares.

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

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

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el aislamiento se realiza por enriquecimiento para una población celular particular mediante selección positiva, o agotamiento de una población celular particular, por selección negativa. En algunos casos que se divulgan 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 casos particulares que se divulgan en el presente documento, una muestra biológica, por ejemplo, una muestra de PBMC u otros leucocitos, se someten a selección de linfocitos T CD4⁺, donde quedan retenidas tanto las fracciones negativas como las positivas. En determinados casos que se divulgan en el presente documento, los linfocitos T CD8⁺ se seleccionan de la fracción negativa. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, una muestra biológica se somete a selección de linfocitos T CD8⁺, donde quedan retenidas tanto las fracciones negativas como las positivas. En determinados casos que se divulgan en el presente documento, los linfocitos T CD4⁺ se seleccionan de la fracción negativa.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los linfocitos T se separan de una muestra de PBMC mediante la selección negativa de marcadores expresados en linfocitos no T, tales como linfocitos B, monocitos u otros leucocitos, tales como CD14. En algunas divulgaciones, se usa una etapa de selección CD4⁺ o CD8⁺ para separar linfocitos T auxiliares CD4⁺ y citotóxicos CD8⁺. Dichas poblaciones CD4⁺ y CD8⁺ pueden clasificarse adicionalmente en subpoblaciones mediante selección positiva o negativa para marcadores expresados o expresados en un grado relativamente mayor en una o más subpoblaciones de linfocitos T sin activación previa, de memoria y/o efectores.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células CD8⁺ se enriquecen adicionalmente en o se agotan de células madre sin activación previa, de memoria central, de memoria efectora y/o de memoria central, tal como por selección positiva o negativa basada en antígenos de superficie asociados a la subpoblación respectiva. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el enriquecimiento en linfocitos T de memoria central (T_{CM}) se realiza para aumentar la eficacia, tal como para mejorar la supervivencia a largo plazo, la expansión y/o el injerto después de la administración, que en algunas divulgaciones es particularmente robusto en dichas subpoblaciones. Véase Terakura *et al.* (2012) *Blood*. 1:72-82; Wang *et al.* (2012) *J Immunother.* 35(9):689-701. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, combinar linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T CD8⁺ enriquecidos en T_{CM} potencia adicionalmente la eficacia.

En casos que se divulgan en el presente documento, los linfocitos T de memoria están presentes en subconjuntos CD62L⁺ y CD62L⁻ de linfocitos de sangre periférica CD8⁺. Las PBMC pueden enriquecerse o empobrecerse en fracciones CD62L⁻CD8⁺ y/o CD62L⁺CD8⁺, tal como usando anticuerpos anti-CD8 y anti-CD62L.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el enriquecimiento en linfocitos T de memoria central (T_{CM}) se basa en una expresión superficial positiva o alta de CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 y/o CD127; en algunas divulgaciones, se basa en la selección negativa de células que expresan o expresan altamente CD45RA y/o granzima B. En algunas divulgaciones, aislamiento de una población de CD8⁺ enriquecida en linfocitos T_{CM} se realiza mediante el agotamiento de células que expresan CD4, CD 14, CD45RA y selección positiva o enriquecimiento en células que expresan CD62L. En una divulgación, el enriquecimiento en linfocitos T de memoria central (T_{CM}) se realiza comenzando con una fracción negativa de células seleccionadas basándose en la expresión de CD4, que se somete a una selección negativa basada en la expresión de CD 14 y CD45RA, y una selección positiva basada en CD62L. Dichas selecciones en algunas divulgaciones se realizan simultáneamente y en otras divulgaciones se realizan secuencialmente, en cualquier orden. En algunas divulgaciones, la misma etapa de selección basada en la expresión

de CD4 utilizada en la preparación de la población o subpoblación de células CD8⁺, también se usa para generar la población o subpoblación de células CD4⁺, de manera que tanto las fracciones positivas como las negativas de la separación basada en CD4 quedan retenidas y se usan en etapas posteriores de los métodos, opcionalmente después de una o más etapas de selección positivas o negativas adicionales.

En un caso particular que se divulga en el presente documento, una muestra de PBMC u otra muestra de leucocitos se somete a selección de células CD4⁺, donde quedan retenidas tanto las fracciones negativas como las positivas. Después, la fracción negativa se somete a una selección negativa basada en la expresión de CD 14 y CD45RA o CD 19, 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 auxiliares T CD4⁺ se clasifican en células sin activación previa, de memoria central y efectoras identificando poblaciones celulares que tienen antígenos de superficie celular. Pueden obtenerse linfocitos CD4⁺ mediante métodos convencionales. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los linfocitos T CD4⁺ sin activación previa son linfocitos T CD45RO⁻, CD45RA⁺, CD62L⁺, CD4⁺. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células CD4⁺ de memoria central son CD62L⁺ y CD45RO⁺. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células CD4⁺ efectoras son CD62L⁻ y CD45RO⁻.

En un caso que se divulga en el presente documento, para enriquecer en células CD4⁺ mediante selección negativa, un cóctel de anticuerpos monoclonales normalmente incluye anticuerpos contra CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR y CD8. En algunos casos que se divulgan 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 que se divulgan en el presente documento, las células y las poblaciones celulares se separan o aíslan usando técnicas de separación inmunomagnéticas (o magnéticas por afinidad) (revisadas en *Methods in Molecular Medicine*, vol. 58: *Metastasis Research Protocols*, Vol. 2: *Cell Behavior In Vitro and In Vivo*, págs. 17-25 Editado por: S. A. Brooks y U. Schumacher © Humana Press Inc., Totowa, NJ).

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

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

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 se unen a la partícula o perla magnética, se unen específicamente a las moléculas de la superficie celular si están presentes en células dentro de la muestra.

En algunas divulgaciones, la muestra se coloca en un campo magnético, y aquellas células que tienen partículas magnéticamente sensibles o magnetizables unidas a las mismas serán atraídas por el imán y se separarán de las células no marcadas. Para la selección positiva, quedan retenidas las células que son atraídas por el imán; para la selección negativa, quedan retenidas las células que no son atraídas (células no marcadas). En algunas divulgaciones, se realiza una combinación de selección positiva y negativa durante la misma etapa de selección, donde las fracciones positivas y negativas quedan retenidas y se procesan adicionalmente o se someten a etapas de separación adicionales.

En determinados casos que se divulgan en el presente documento, las partículas magnéticamente sensibles se recubren con anticuerpos primarios u otros compañeros de unión, anticuerpos secundarios, lectinas, enzimas o estreptavidina. En determinados casos que se divulgan 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 que se divulgan en el presente documento, las células, en lugar de las perlas, se marcan con un anticuerpo primario o compañero de unión, y después se añaden partículas magnéticas recubiertas con un anticuerpo secundario específico de tipo celular u otro compañero de unión (por ejemplo, estreptavidina). En determinados casos que se divulgan en el presente documento, las partículas magnéticas recubiertas con estreptavidina se usan junto con anticuerpos primarios o secundarios biotinilados.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las partículas magnéticamente sensibles se dejan unidas a las células que posteriormente se van a incubar, cultivar y/o modificar por ingeniería genética; en algunas divulgaciones, las partículas se dejan unidas a las células para su administración a un paciente. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las partículas magnetizables o magnéticamente sensibles se retiran de las células. Se conocen métodos para retirar partículas magnetizables de las células e incluyen, por ejemplo, el uso de anticuerpos competitivos no marcados y partículas magnetizables o anticuerpos conjugados con enlazadores escindibles. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las partículas magnetizables son biodegradables.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la selección basada en afinidad es a través de clasificación celular activada magnéticamente (MACS, por sus siglas en inglés) (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Los sistemas de Clasificación celular activada magnéticamente (MACS) son capaces de seleccionar células de alta pureza que tienen partículas magnetizadas unidas a las mismas. En determinados casos que se divulgan en el presente documento, MACS funciona en un modo en el que las especies no diana y diana se eluyen secuencialmente después de la aplicación del campo magnético externo. Es decir, las células unidas a partículas magnetizadas se mantienen en su lugar mientras se eluyen las especies no unidas. Entonces, después de que se completa esta primera etapa de elución, las especies que quedaron atrapadas en el campo magnético y se evitó que eluyeran se liberan de alguna manera para que puedan eluir y recuperarse. En determinados casos que se divulgan en el presente documento, las células no diana se marcan y se agotan de la población heterogénea de células.

En determinados casos que se divulgan en el presente documento, el aislamiento o separación se realiza usando un sistema, dispositivo o aparato que realiza uno o más de las etapas de aislamiento, preparación celular, separación, procesamiento, incubación, cultivo y/o formulación de los métodos. En algunas divulgaciones, el sistema se usa para realizar cada una de estas etapas en un entorno cerrado o estéril, por ejemplo, para minimizar el error, la manipulación y/o la contaminación por parte del usuario. En un caso que se divulga 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 algunos casos que se divulgan en el presente documento, el sistema o aparato realiza una o más, por ejemplo, todas, las etapas de aislamiento, procesamiento, modificación por ingeniería genética y formulación en un sistema integrado o autónomo, y/o de una manera automatizada o programable. En algunas divulgaciones, el sistema o aparato incluye un ordenador y/o programa informático en comunicación con el sistema o aparato, lo 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 genética y formulación.

En algunas divulgaciones, la separación y/u otras etapas se realizan usando el sistema CliniMACS (Miltenyi Biotec), por ejemplo, para la separación automatizada de células a nivel de escala clínica en un sistema cerrado y estéril. Los componentes pueden incluir un microordenador integrado, unidad de separación magnética, bomba peristáltica y diversas válvulas de pinza. El ordenador integrado en algunas divulgaciones controla todos los componentes del instrumento y dirige el sistema para realizar procedimientos repetidos en una secuencia normalizada. La unidad de separación magnética en algunas divulgaciones 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.

El sistema CliniMACS en algunas divulgaciones usa partículas magnetizables acopladas a anticuerpos que se suministran en una solución estéril, apirógena. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, después de marcar las células con partículas magnéticas, las células se lavan para retirar el exceso de partículas. Después, se conecta una bolsa de preparación celular al conjunto de tubos, que a su vez está conectado a una bolsa que contiene tampón y una bolsa de recogida de células. El conjunto de tubos consiste en tubos estériles preensamblados, que incluyen una precolumna y una columna de separación, y son para un solo uso. Después del inicio del programa de separación, el sistema aplica automáticamente la muestra de células en la columna de separación. Las células marcadas quedan retenidas dentro de la columna, mientras que las células no marcadas se retiran mediante una serie de etapas de lavado. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las poblaciones celulares para su uso con los métodos que se describen en el presente documento están sin marcar y no quedan retenidas en la columna. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las poblaciones celulares para su uso con los métodos que se describen en el presente documento se marcan y quedan retenidas en la columna. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las poblaciones de células para su uso con los métodos que se describen en el presente documento eluyen de la columna después de la retirada del campo magnético y se recogen dentro de la bolsa de recogida de células.

En determinados casos que se divulgan en el presente documento, la separación y/u otras etapas se realizan usando el sistema CliniMACS Prodigy (Miltenyi Biotec). El sistema CliniMACS Prodigy en algunas divulgaciones está equipado con una unidad de procesamiento celular que permite el lavado y fraccionamiento automatizados de células mediante centrifugación. El sistema CliniMACS Prodigy también puede incluir una cámara a bordo y software de reconocimiento de imágenes que determina el punto final de fraccionamiento celular óptimo al discernir las capas macroscópicas del producto celular de origen. Por ejemplo, la sangre periférica se separa automáticamente en capas de eritrocitos,

leucocitos y plasma. El sistema ClniMACS Prodigy también puede incluir una cámara de cultivo celular integrada que realiza protocolos de cultivo celular tales como, por ejemplo, diferenciación y expansión celular, carga de antígeno y cultivo celular a largo plazo. Los puertos de entrada pueden permitir la extracción estéril y la reposición de medio y las células se pueden controlar usando un microscopio integrado. Véase, por ejemplo, Klebanoff *et al.* (2012) *J Immunother.* 35(9): 651-660, Terakura *et al.* (2012) *Blood*.1:72-82, y Wang *et al.* (2012) *J Immunother.* 35(9):689-701.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, una población celular que se describe en el presente documento se recoge y se enriquece (o se agota) mediante citometría de flujo, en la que las células teñidas para múltiples marcadores de superficie celular se transportan en una corriente fluidica. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, una población celular que se describe en el presente documento se recoge y se enriquece (o se agota) a través de clasificación por escala preparativa (FACS, por sus siglas en inglés). En determinados casos que se divulgan en el presente documento, una población de células que se describe en el presente documento se recoge y se enriquece (o se agota) mediante el uso de chips de sistemas microelectromecánicos (MEMS, por sus siglas en inglés) en combinación con un sistema de detección basado en FACS (véase, por ejemplo, el documento WO 2010/033140, Cho *et al.* (2010) *Lab Chip* 10, 1567-1573; y Godin *et al.* (2008) *J Biophoton.* 1(5):355-376. En ambos casos que se divulgan en el presente documento, las células se pueden marcar con múltiples marcadores, permitiendo el aislamiento de subconjuntos de linfocitos T bien definidos con alta pureza.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los anticuerpos o compañeros de unión se marcan con uno o más marcadores detectables, para facilitar la separación para la selección positiva y/o negativa. Por ejemplo, la separación puede basarse en la unión a anticuerpos marcados con fluorescencia. En algunos casos que se divulgan 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 transportan en una corriente fluidica, tal como por clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), incluyendo escala preparativa (FACS) y/o chips de sistemas microelectromecánicos (MEMS), por ejemplo, en combinación con un sistema de detección por citometría de flujo. Dichos métodos permiten la selección positiva y negativa basándose en múltiples marcadores simultáneamente.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos de preparación incluyen etapas para congelar, por ejemplo, criopreservar, las células, ya sea antes o después del aislamiento, incubación y/o modificación por ingeniería genética. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la etapa de congelación y posterior descongelación retira los granulocitos y, hasta cierto punto, los monocitos en la población celular. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células se suspenden en una solución de congelación, por ejemplo, después de una etapa de lavado para retirar el plasma y las plaquetas. Puede usarse cualquiera de una diversidad de soluciones y parámetros de congelación conocidos en algunas divulgaciones. Un caso que se divulga en el presente documento implica el uso de PBS que contiene DMSO al 20 % y albúmina sérica humano (HSA) al 8 %, u otro medio de congelación celular adecuado. Después, esto se diluye 1:1 con medio para que la concentración final de DMSO y HSA sea del 10 % y del 4 %, respectivamente. Las células se congelan generalmente a -80 °C a una velocidad de 1 °C por minuto y se almacenan en la fase de vapor de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el aislamiento y/o la selección dan como resultado una o más composiciones de entrada de linfocitos T enriquecidos, por ejemplo, linfocitos T CD3+, linfocitos T CD4+ y/o linfocitos T CD8+. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, dos o más composiciones de entrada separadas se aíslan, seleccionan, enriquecen u obtienen a partir de una única muestra biológica. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las composiciones de entrada separadas se aíslan, seleccionan, enriquecen y/u obtienen a partir de muestras biológicas separadas recogidas, tomadas y/u obtenidas del mismo sujeto.

En determinados casos que se divulgan en el presente documento, la una o más composiciones de entrada son o incluyen una composición de linfocitos T enriquecidos que incluye 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 98%, al menos el 99%, al menos el 99,5%, al menos el 99,9 % o exactamente o aproximadamente el 100 % de linfocitos T CD3+. En un caso particular que se divulga en el presente documento, la composición de entrada de los linfocitos T enriquecidos consiste esencialmente en linfocitos T CD3+.

En determinados casos que se divulgan en el presente documento, la una o más composiciones de entrada son o incluyen una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos que incluye 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 98%, al menos el 99%, al menos el 99,5%, al menos el 99,9 % o exactamente o aproximadamente el 100 % de linfocitos T CD4+. En determinados casos que se divulgan en el presente documento, la composición de entrada de linfocitos T CD4+ incluye menos del 40 %, menos del 35%, menos del 30%, menos del 25%, menos del 20%, menos del 15%, menos del 10 %, menos del 5%, menos del 1%, menos del 0,1 % o menos del 0,01 % de linfocitos T CD8+, y/o no contiene linfocitos T CD8+, y/o está libre o sustancialmente libre de linfocitos T CD8+. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la composición de los linfocitos T enriquecidos consiste esencialmente en linfocitos T CD4+.

En determinados casos que se divulgan en el presente documento, la una o más composiciones son o incluyen una composición de linfocitos T CD8+ que es o incluye 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 98%, al menos el 99%, al menos el 99,5%, al menos el 99,9 % o exactamente o aproximadamente el 100 % de linfocitos T CD8+. En determinados casos que se divulgan en el presente documento, la composición de los linfocitos T CD8+ contiene menos del 40 %, menos del 35%, menos del 30%, menos del 25%, menos del 20%, menos del 15%, menos del 10 %, menos del 5%, menos del 1%, menos del 0,1 % o menos del 0,01 % de linfocitos T CD4+, y/o no contiene linfocitos T CD4+, y/o está libre de o sustancialmente libre de linfocitos T CD4+. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la composición de los linfocitos T enriquecidos consiste esencialmente en linfocitos T CD8+.

B. Activación y estimulación

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células se incuban y/o cultivan antes de o en relación con la modificación por ingeniería genética. Las etapas de incubación pueden incluir cultivo, siembra, estimulación, activación y/o propagación. La incubación y/o la modificación por ingeniería genética pueden realizarse en un recipiente de cultivo, tal como una unidad, cámara, pocillo, columna, tubo, conjunto de tubos, válvula, vial, plato de cultivo, bolsa u otro recipiente para el cultivo o siembra de células. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las composiciones o células se incuban en presencia de condiciones estimuladoras o un agente estimulador. Dichas condiciones incluyen aquellas diseñadas para inducir la proliferación, expansión, activación y/o supervivencia de células en la población, para imitar la exposición al antígeno y/o para cebar las células para la modificación por ingeniería genética, tal como para la introducción de un receptor de antígeno recombinante.

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

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las condiciones o agentes estimuladores incluyen uno o más agentes, por ejemplo, ligando, que es capaz de estimular o activar un dominio de señalización intracelular de un complejo de TCR. En algunas divulgaciones, el agente activa o inicia la cascada de señalización intracelular de TCR/CD3 en un linfocito T. Dichos agentes pueden incluir anticuerpos, tales como aquellos específicos para un TCR, por ejemplo, anti-CD3. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las condiciones estimuladoras incluyen uno o más agentes, por ejemplo, ligando, que es capaz de estimular un receptor coestimulador, por ejemplo, anti-CD28. En algunos casos que se divulgan 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, el método de expansión puede comprender además la etapa de añadir anticuerpo anti-CD3 y/o anti-CD28 al medio de cultivo (por ejemplo, a una concentración de al menos aproximadamente 0,5 ng/ml). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los agentes estimuladores incluyen IL-2, IL-15 y/o IL-7. En algunas divulgaciones, la concentración de IL-2 es de al menos aproximadamente 10 unidades/ml.

En algunas divulgaciones, la incubación se realiza de acuerdo con técnicas tales como las que se describen en la Patente de los EE.UU. N.º 6.040.177 de Riddell *et al.*, Klebanoff *et al.* (2012) *J Immunother.* 35(9): 651-660, Terakura *et al.* (2012) *Blood* 1:72-82 y Wvong *et al.* (2012) *J Immunother.* 35(9):689-701.

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

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las condiciones estimuladoras incluyen una temperatura adecuada para el crecimiento de linfocitos T humanos, por ejemplo, al menos aproximadamente 25 grados Celsius, generalmente al menos aproximadamente 30 grados y generalmente exactamente o aproximadamente 37 grados Celsius. Opcionalmente, la incubación puede comprender además añadir células linfoblastoides transformadas por EBV (LCL) que no se dividen como células alimentadoras. Las LCL puede irradiarse con rayos gamma en el intervalo de aproximadamente 6000 a 10.000 rads. Las células alimentadoras de LCL en algunas divulgaciones se proporcionan en cualquier cantidad adecuada, tal como una relación de células alimentadoras de LCL a linfocitos T iniciales de al menos aproximadamente 10:1.

En casos que se divulgan en el presente documento, se obtienen linfocitos T específicos de antígeno, tales como linfocitos T CD4+ y/o CD8+ específicos de antígeno, estimulando linfocitos T sin activación previa o específicos de

antígeno con antígeno. Por ejemplo, pueden generarse estirpes de linfocitos T específicos de antígeno o clones para antígenos de citomegalovirus aislando linfocitos T de sujetos infectados y estimulando las células *in vitro* con el mismo antígeno.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, al menos una porción de la incubación en presencia de una o más condiciones estimuladoras o agentes estimuladores se realiza en la cavidad interna de una cámara centrífuga, por ejemplo, con rotación centrífuga, tal como se describe en la Publicación Internacional Número WO2016/073602. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, al menos una porción de la incubación realizada en una cámara centrífuga incluye mezclar con un reactivo o reactivos para inducir la estimulación y/o activación. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células, tales como las células seleccionadas, se mezclan con una condición estimuladora o agente estimulador en la cámara centrífuga. En algunas divulgaciones de dichos procesos, un volumen de células se mezcla con una cantidad de una o más condiciones o agentes estimuladores que es mucho menor que la que se emplea normalmente cuando se realizan estimulaciones similares en una placa de cultivo celular u otro sistema.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente estimulador se añade a las células en la cavidad de la cámara en una cantidad que es sustancialmente inferior (por ejemplo, no es más del 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 % u 80 % de la cantidad) en comparación con la cantidad del agente estimulador que se usa normalmente o sería necesario para conseguir aproximadamente la misma o similar eficiencia de selección del mismo número de células o el mismo volumen de células cuando la selección se realiza sin mezclar en una cámara centrífuga, por ejemplo, en un tubo o bolsa con agitación o rotación periódica. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la incubación se realiza con la adición de un tampón de incubación a las células y un agente estimulador para conseguir un volumen objetivo con la incubación del reactivo de, por ejemplo, de 10 ml a 200 ml, tal como al menos o aproximadamente al menos o aproximadamente o 10 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml, 50 ml, 60 ml, 70 ml, 80 ml, 90 ml, 100 ml, 150 ml o 200 ml. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el tampón de incubación y el agente estimulador se mezclan anteriormente antes de la adición a las células. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el tampón de incubación y el agente estimulador se añaden por separado a las células. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la incubación estimuladora se realiza con condiciones de mezcla periódicas suaves, lo que puede ayudar a promover interacciones energéticamente favorecidas y, por lo tanto, permitir el uso de menos agente estimulador general mientras se consigue la estimulación y activación de las células.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la incubación se realiza generalmente en condiciones de mezcla, tal como en presencia de centrifugación, generalmente a una fuerza o velocidad relativamente baja, tal como una velocidad inferior a la utilizada para sedimentar las células, tal como desde o de aproximadamente 600 rpm a 1700 rpm (por ejemplo, exactamente o aproximadamente o al menos 600 rpm, 1000 rpm, o 1500 rpm o 1700 rpm), tal como a una RCF en la muestra o pared de la cámara u otro recipiente de desde o de aproximadamente 80 g a 100 g (por ejemplo, exactamente o aproximadamente o al menos 80 g, 85 g, 90 g, 95 g o 100 g). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la centrifugación se realiza usando intervalos repetidos de una centrifugación a dicha velocidad baja seguidos de un período de descanso, tal como una centrifugación y/o descanso durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 segundos, tal como una centrifugación a aproximadamente 1 o 2 segundos seguida de un descanso durante aproximadamente 5, 6, 7 u 8 segundos.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la duración total de la incubación, por ejemplo, con el agente estimulador, es de entre o entre aproximadamente 1 hora y 96 horas, 1 hora y 72 horas, 1 hora y 48 horas, 4 horas y 36 horas, 8 horas y 30 horas o 12 horas y 24 horas, tal como al menos o aproximadamente al menos 6 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas o 72 horas. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la incubación adicional es durante un tiempo entre o aproximadamente entre 1 hora y 48 horas, 4 horas y 36 horas, 8 horas y 30 horas o 12 horas y 24 horas, inclusive.

En casos particulares que se divulgan en el presente documento, las condiciones estimuladoras incluyen incubar, cultivar y/o sembrar una composición de linfocitos T enriquecidos con y/o en presencia de una o más citocinas. En casos particulares que se divulgan en el presente documento, la una o más citocinas son citocinas recombinantes. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la una o más citocinas son citocinas recombinantes humanas. En determinados casos que se divulgan en el presente documento, la una o más citocinas se unen a y/o son capaces de unirse a receptores que se expresan por y/o son endógenos a los linfocitos T. En casos particulares que se divulgan en el presente documento, la una o más citocinas son o incluyen un miembro de la familia de citocinas de haces de 4-alfa-hélices. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los miembros de la familia de citocinas de haces de 4-alfa-hélices incluyen, 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 estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF).

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la estimulación da como resultado la activación y/o proliferación de las células, por ejemplo, antes de la transducción.

C. Vectores y métodos para modificación por ingeniería genética

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células modificadas por ingeniería genética, tales como linfocitos T, utilizadas en relación con los métodos, usos, artículos de fabricación o composiciones que se divulgan son células que se han modificado genéticamente para expresar un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR o un TCR que se describen en el presente documento. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células se modifican por ingeniería genética mediante introducción, suministro o transferencia de secuencias de ácido nucleico que codifican el receptor recombinante y/u otras moléculas.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos para producir células modificadas por ingeniería genética incluyen la introducción de un polinucleótido que codifica un receptor recombinante (por ejemplo, CAR anti-CD 19) en una célula, por ejemplo, tal como una célula estimulada o activada. En casos particulares que se divulgan en el presente documento, las proteínas recombinantes son receptores recombinantes, tales como cualesquiera que se describen. La introducción de las moléculas de ácido nucleico que codifican la proteína recombinante, tal como un receptor recombinante, en la célula puede realizarse usando cualquiera de un número de vectores conocidos. Dichos vectores incluyen sistemas víricos y no víricos, incluyendo sistemas lentivíricos y gammaretrovíricos, así como sistemas basados en transposones tales como sistemas de transferencia de genes basados en PiggyBac o Sleeping Beauty. Los métodos de ejemplo incluyen aquellos para la transferencia de ácidos nucleicos que codifican los receptores, incluso a través transducción vírica, por ejemplo, retrovírica o lentivírica, transposones y electroporación. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la modificación por ingeniería genética produce una o más composiciones modificadas por ingeniería genética de linfocitos T enriquecidos.

En determinados casos que se divulgan en el presente documento, la una o más composiciones de linfocitos T estimulados son o incluyen dos composiciones estimuladas separadas de linfocitos T enriquecidos. En casos particulares que se divulgan en el presente documento, dos composiciones separadas de linfocitos T enriquecidos, por ejemplo, dos composiciones separadas de linfocitos T enriquecidos que se han seleccionado, aislado y/o enriquecido a partir de la misma muestra biológica, se modifican por ingeniería genética por separado. En determinados casos que se divulgan en el presente documento, las dos composiciones separadas incluyen una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos. En casos particulares que se divulgan en el presente documento, las dos composiciones separadas incluyen una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, dos composiciones separadas de linfocitos T CD4+ enriquecidos y linfocitos T CD8+ enriquecidos se modifican genéticamente por separado.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la transferencia de genes se logra estimulando en primer lugar la célula, tal como combinándola con un estímulo que induce una respuesta tal como proliferación, supervivencia y/o activación, por ejemplo, medida por la expresión de una citocina o marcador de activación, seguido de la transducción de las células activadas y la expansión en cultivo a números suficientes para aplicaciones clínicas. En determinados casos que se divulgan en el presente documento, la transferencia génica se logra incubando en primer lugar las células en condiciones estimuladoras, tal como mediante cualquiera de los métodos que se describen.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos para la modificación por ingeniería genética se realizan poniendo en contacto una o más células de una composición con una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína recombinante, por ejemplo, receptor recombinante. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el contacto puede efectuarse con centrifugación, tal como espinoculación (por ejemplo, inoculación centrífuga). Dichos métodos incluyen cualquiera de los que se describen en la Publicación Internacional Número WO2016/073602. Las cámaras centrífugas de ejemplo incluyen aquellas producidas y comercializadas por Biosafe SA, incluyendo aquellas para su uso con el sistema Sepax® y Sepax® 2, incluyendo cámaras centrífugas A-200/F y A-200 y diversos kits para su uso con dichos sistemas. Se describen cámaras, sistemas e instrumentación y armarios de procesamiento de ejemplo, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. N.º 6.123.655, la Patente de los EE.UU. N.º 6.733.433 y la Solicitud de Patente de los EE. UU. Publicada, Publicación N.º: US 2008/0171951 y la solicitud de patente internacional publicada, publicación n.º WO 00/38762. Los kits de ejemplo para su uso con dichos 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 que se divulgan en el presente documento, el contacto puede efectuarse con centrifugación, tal como espinoculación (por ejemplo, inoculación centrífuga). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la composición que contiene células, partículas víricas y reactivo se puede rotar, generalmente a una fuerza o velocidad relativamente baja, tal como una velocidad inferior a la utilizada para sedimentar las células, tal como desde o de aproximadamente 600 rpm a 1700 rpm (por ejemplo, exactamente o aproximadamente o al menos 600 rpm, 1000 rpm, o 1500 rpm o 1700 rpm). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la rotación se realiza con una fuerza, por ejemplo, una fuerza centrífuga relativa, de desde o de aproximadamente 100 g a 3200 g (por ejemplo, exactamente o aproximadamente o al menos exactamente 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), medida, por ejemplo, en una pared interna o externa de la cámara o cavidad. La expresión "fuerza centrífuga relativa" o RCF, por sus siglas en inglés, se entiende generalmente como la fuerza eficaz transmitida sobre un objeto o sustancia (tal como una célula, muestra o sedimento y/o un punto en la cámara u otro recipiente que se está rotando), con respecto a la fuerza gravitacional de la tierra, en un punto particular en el espacio en comparación con el eje de rotación. El valor puede determinarse usando fórmulas

bien conocidas, teniendo en cuenta la fuerza gravitacional, la velocidad de rotación y el radio de rotación (distancia desde el eje de rotación y el objeto, sustancia o partícula en que se está midiendo la RCF).

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la introducción se realiza poniendo en contacto una o más células de una composición con una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína recombinante, por ejemplo, receptor recombinante. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el contacto puede efectuarse con centrifugación, tal como espinoculación (por ejemplo, inoculación centrífuga). Dichos métodos incluyen cualquiera de los que se describen en la Publicación Internacional Número WO2016/073602. Las cámaras centrífugas de ejemplo incluyen aquellas producidas y comercializadas por Biosafe SA, incluyendo aquellas para su uso con el sistema Sepax® y Sepax® 2, incluyendo cámaras centrífugas A-200/F y A-200 y diversos kits para su uso con dichos sistemas. Se describen cámaras, sistemas e instrumentación y armarios de procesamiento de ejemplo, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. N.º 6.123.655, la Patente de los EE.UU. N.º 6.733.433 y la Solicitud de Patente de los EE. UU. Publicada, Publicación N.º: US 2008/0171951 y la solicitud de patente internacional publicada, publicación n.º WO 00/38762. Los kits de ejemplo para su uso con dichos 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 que se divulgan en el presente documento, el sistema se incluye y/o se coloca en asociación con otra instrumentación, incluyendo instrumentación para operar, automatizar, controlar y/o vigilar aspectos de la etapa de transducción y una o más diversas etapas de procesamiento realizadas en el sistema, por ejemplo, una o más etapas de procesamiento que pueden realizarse con o en relación con el sistema de cámara centrífuga como se describe en el presente documento o en la Publicación Internacional Número WO2016/073602. Esta instrumentación en algunos casos que se divulgan en el presente documento está contenida dentro de un armario. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la instrumentación incluye 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 los EE.UU. N.º 6.123.655, la Patente de los EE.UU. N.º 6.733.433 y el documento US 2008/0171951.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el sistema comprende una serie de recipientes, por ejemplo, bolsas, tubos, llaves de paso, abrazaderas, conectores y una cámara de centrífuga. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los recipientes, tales como bolsas, incluyen uno o más recipientes, tales como bolsas, que contiene las células que se han de transducir y las partículas de vector vírico, en el mismo recipiente o en recipientes separados, tal como la misma bolsa o bolsas separadas. En algunos casos que se divulgan 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/u otros componentes para diluir, resuspender y/o lavar componentes y/o composiciones durante los métodos. Los recipientes se pueden conectar en una o más posiciones en el 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 que se divulgan en el presente documento, la cámara se asocia a una centrífuga, que es capaz de efectuar la rotación de la cámara, tal como alrededor de su eje de rotación. La rotación puede ocurrir antes, durante y/o después de la incubación en relación con la transducción de las células y/o en una o más de las otras etapas de procesamiento. Por lo tanto, en algunos casos que se divulgan en el presente documento, una o más de las diversas etapas de procesamiento se realizan con rotación, por ejemplo, a una fuerza particular. La cámara es normalmente capaz de rotación vertical o generalmente vertical, de manera que la cámara se asienta verticalmente durante la centrifugación y la pared lateral y el eje son verticales o generalmente verticales, con la pared o paredes de extremo horizontales o generalmente horizontales.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la composición que contiene células, el vector, por ejemplo, las partículas víricas y el reactivo se pueden rotar, generalmente a una fuerza o velocidad relativamente baja, tal como una velocidad inferior a la utilizada para sedimentar las células, tal como desde o de aproximadamente 600 rpm a 1700 rpm (por ejemplo, exactamente o aproximadamente o al menos 600 rpm, 1000 rpm, o 1500 rpm o 1700 rpm). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la rotación se realiza con una fuerza, por ejemplo, una fuerza centrífuga relativa, de desde o de aproximadamente 100 g a 3200 g (por ejemplo, exactamente o aproximadamente o al menos exactamente 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), medida, por ejemplo, en una pared interna o externa de la cámara o cavidad. La expresión "fuerza centrífuga relativa" o RCF, por sus siglas en inglés, se entiende generalmente como la fuerza eficaz transmitida sobre un objeto o sustancia (tal como una célula, muestra o sedimento y/o un punto en la cámara u otro recipiente que se está rotando), con respecto a la fuerza gravitacional de la tierra, en un punto particular en el espacio en comparación con el eje de rotación. El valor puede determinarse usando fórmulas bien conocidas, teniendo en cuenta la fuerza gravitacional, la velocidad de rotación y el radio de rotación (distancia desde el eje de rotación y el objeto, sustancia o partícula en que se está midiendo la RCF).

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, durante al menos una parte de la modificación por ingeniería genética, por ejemplo, transducción, y/o después de la modificación por ingeniería genética, las células se transfieren a un conjunto de bolsas de biorreactor para el cultivo de las células modificadas genéticamente, tal como para el cultivo o la expansión de las células.

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

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el vector retrovílico tiene una secuencia de repetición terminal larga (LTR, por sus siglas en inglés), por ejemplo, un vector retrovílico derivado del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV), virus del sarcoma mieloproliferativo (MPSV), virus de células madre embrionarias murinas (MESV), virus de células madre murinas (MSCV) o virus formador de focos de bazo (SFFV). La mayoría de los vectores retrovíricos derivan de retrovirus murinos. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los retrovirus incluyen los derivados de cualquier fuente de células aviares o de mamíferos. Los retrovirus normalmente son anfotrópicos, lo que significa que son capaces de infectar células hospedadoras de varias especies, incluyendo seres humanos. En un caso que se divulga en el presente documento, el gen que ha de expresarse reemplaza las secuencias gag, pol y/o env retrovíricas. Se han descrito varios sistemas retrovíricos ilustrativos (por ejemplo, Patente de los EE.UU. N.º 5.219.740; 6.207.453; 5.219.740; Miller y Rosman (1989) *BioTechniques* 7:980-990; Miller, A. D. (1990) *Human Gene Therapy* 1:5-14; Scarpa *et al.* (1991) *Virology* 180:849-852; Burns *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8033-8037; y Boris-Lawrie y Temin (1993) *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3:102-109.

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

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las partículas de vector vírico contienen un genoma derivado de un vector basado en genoma retrovílico, tal como derivado de un vector basado en genoma lentivílico. En algunas divulgaciones de los vectores víricos divulgados, el ácido nucleico heterólogo que codifica un receptor recombinante, tal como un receptor de antígeno, tal como un CAR, está contenido y/o ubicado entre las secuencias LTR 5' y LTR 3' del genoma del vector.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el genoma del vector vírico es un genoma lentivílico, tal como un genoma de VIH-1 o un genoma de SIV. Por ejemplo, se han generado vectores lentivíricos mediante la atenuación múltiple de genes de virulencia, por ejemplo, los genes env, vif, vpr y nef pueden suprimirse, haciendo que el vector sea más seguro para fines terapéuticos. Se conocen vectores lentivíricos. Véase Naldini *et al.*, (1996 y 1998); Zufferey *et al.*, (1997); Dull *et al.*, 1998, las Patentes de los EE.UU. N.º 6.013.516; y 5.994.136). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, estos vectores víricos se basan en plásmidos o virus, y se configuran para portar las secuencias esenciales para incorporar ácido nucleico extraño, para la selección y para la transferencia del ácido nucleico a una célula hospedadora. Los lentivirus conocidos pueden obtenerse fácilmente de depósitos o colecciones tales como la Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC"; 10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209), o pueden aislarse de fuentes conocidas usando técnicas disponibles habitualmente.

Los ejemplos no limitantes de vectores lentivíricos incluyen los derivados de un lentivirus, tales como el virus de inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1), VIH-2, un virus de inmunodeficiencia de simios (SIV), virus linfotrópico T humano 1 (HTLV-1), HTLV-2 o virus de la anemia por infección equino (E1AV). Por ejemplo, se han generado vectores lentivíricos atenuando de manera múltiple los genes de virulencia del VIH, por ejemplo, los genes env, vif, vpr, vpu y nef se suprimen, haciendo que el vector sea más seguro para fines terapéuticos. Se conocen en la técnica vectores lentivíricos, véase Naldini *et al.*, (1996 y 1998); Zufferey *et al.*, (1997); Dull *et al.*, 1998, las Patentes de los EE.UU. N.º 6.013.516; y 5.994.136). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, estos vectores víricos se basan en plásmidos o virus, y se configuran para portar las secuencias esenciales para incorporar ácido nucleico extraño, para la selección y para la transferencia del ácido nucleico a una célula hospedadora. Los lentivirus conocidos pueden obtenerse fácilmente de depósitos o colecciones tales como la Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC"; 10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209), o pueden aislarse de fuentes conocidas usando técnicas disponibles habitualmente.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el vector de genoma vírico puede contener secuencias de las LTR 5' y 3' de un retrovirus, tal como un lentivirus. En algunas divulgaciones, la construcción de 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 de LTR pueden ser secuencias de LTR de cualquier lentivirus de cualquier especie. Por ejemplo, pueden ser secuencias de LTR de VIH, SIV, FIV o BIV. Normalmente, las secuencias de LTR son secuencias de LTR de VIH.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el ácido nucleico de un vector vírico, tal como un vector vírico de VIH, carece de unidades transcripcionales adicionales. El genoma del vector puede contener una LTR 3'

inactivada o autoinactivadora (Zufferey *et al.* *J Virol* 72: 9873, 1998; Miyoshi *et al.*, *J Virol* 72:8150, 1998). Por ejemplo, puede usarse la delección en la región U3 de la LTR 3' del ácido nucleico utilizado para producir el ARN de vector vírico para generar vectores autoinactivadores (SIN, por sus siglas en inglés). Después, esta delección puede transferirse 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, por sus siglas en inglés) 3', que se copia en la LTR 5' durante la integración vectorial. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, se puede eliminar suficiente secuencia, incluyendo la retirada de una caja TATA, para suprimir la actividad transcripcional de la LTR. Esto puede evitar la producción de ARN de vector de longitud completa en células transducidas. En algunas divulgaciones, 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 LTR 3' autoinactivadora, 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 puede construirse mediante cualquier método conocido en la técnica. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, esto no afecta a los títulos de vector o a las propiedades *in vitro* o *in vivo* del vector.

Opcionalmente, la secuencia U3 de la LTR 5' lentivírica puede reemplazarse con una secuencia promotora en la construcción vírica, tal como una secuencia promotora heteróloga. Esto puede aumentar el título de virus recuperado de la estirpe celular de empaquetamiento. También puede incluirse una secuencia potenciadora. Puede usarse cualquier combinación de potenciador/promotor que aumente la expresión del genoma de ARN vírico en la estirpe celular de empaquetamiento. En un caso que se divulga en el presente documento, se usa la secuencia potenciadora/promotora de CMV (Patente de los EE.UU. N.º 5.385.839 y Patente de los EE.UU. N.º 5.168.062).

En determinados casos que se divulgan en el presente documento, el riesgo de mutagénesis por inserción puede minimizarse construyendo el genoma del vector retrovírico, tal como el genoma del vector lentivírico, para que sea de integración defectuosa. Se puede buscar una diversidad de enfoques para producir un genoma de vector de no integración. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, una o más mutaciones pueden modificarse por ingeniería genética en el componente de enzima integrasa del gen pol, de manera que codifique una proteína con una integrasa inactiva. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el propio genoma del vector puede modificarse para evitar la integración, por ejemplo, mutando o suprimiendo uno o ambos sitios de unión, o haciendo que el tracto de polipurina proximal (PPT) a LTR 3' no sea funcional a través de delección o modificación. En algunos casos que se divulgan 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 mutuamente excluyentes; es decir, puede usarse más de uno de ellos a la vez. Por ejemplo, tanto la integrasa como los sitios de unión pueden ser no funcionales, o la integrasa y el sitio de PPT pueden ser no funcionales, o los sitios de unión y el sitio de PPT pueden ser no funcionales, o todos ellos pueden ser no funcionales. Dichos métodos y genomas de vectores víricos se conocen 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 que se divulgan en el presente documento, el vector contiene secuencias para la propagación en una célula hospedadora, tal como una célula hospedadora procariota. En algunos casos que se divulgan 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 que se divulgan 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 resistencia a fármacos.

El genoma del vector vírico se construye normalmente en una forma de plásmido que puede transfectarse en una estirpe celular de empaquetamiento o productora. Puede usarse cualquiera de una diversidad de métodos conocidos para producir partículas retrovíricas cuyo genoma contiene una copia de ARN del genoma del vector vírico. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, al menos dos componentes están implicados en la fabricación de un sistema de suministro de genes basado en virus: en primer lugar, plásmidos de empaquetamiento, que abarca las proteínas estructurales, así como las enzimas necesarias para generar una partícula de vector vírico, y en segundo lugar, el propio vector vírico, es decir, el material genético que ha de transferirse. Pueden introducirse salvaguardas de bioseguridad en el diseño de uno o ambos de estos componentes.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el plásmido de empaquetamiento puede contener todas las proteínas retrovíricas, tales como HIV-1, distintas de las proteínas de la envuelta (Naldini *et al.*, 1998). En otros casos que se divulgan en el presente documento, los vectores víricos pueden carecer de genes víricos adicionales, tales como los que se asocian a la virulencia, por ejemplo, vpr, vif, vpu y nef, y/o Tat, un transactivador primario del VIH. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los vectores lentivíricos, tales como los vectores lentivíricos a base de 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 silvestre a través de recombinación.

En algunos casos que se divulgan 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

vírico, transcrito a partir 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 algunas divulgaciones, con el fin de evitar la replicación del genoma en la célula diana, sin embargo, los genes víricos endógenos necesarios para la replicación se retiran y se proporcionan por separado en la estirpe celular de empaquetamiento.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, una estirpe celular de empaquetamiento se transfecta con uno o más vectores plasmídicos que contienen los componentes necesarios para generar las partículas. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, una estirpe celular de empaquetamiento se transfecta con un plásmido que contiene el genoma del vector vírico, incluyendo las LTR, la secuencia de empaquetamiento que actúa 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 que se divulgan en el presente documento, se utilizan múltiples vectores para separar los diversos componentes genéticos que generan las partículas de vector retroviral. En algunos de dichos casos que se divulgan en el presente documento, proporcionar vectores separados a la célula de empaquetamiento reduce la posibilidad de acontecimientos de recombinación que de otro modo podrían generar virus competentes para la replicación. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, puede usarse un único vector plasmídico que tenga todos los componentes retrovíricos.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la partícula de vector retroviral, tal como la partícula de vector lentiviral, se pseudotipa para aumentar la eficiencia de transducción de las células hospedadoras. Por ejemplo, una partícula de vector retroviral, tal como una partícula de vector lentiviral, en algunos casos que se divulgan en el presente documento se pseudotipa con una glicoproteína de VSV-G, lo que proporciona una amplia gama de hospedadores celulares que amplía los tipos celulares que pueden transducirse. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, una estirpe celular de empaquetamiento se transfecta con un plásmido o polinucleótido que codifica una glicoproteína de envuelta no nativa, tal como para incluir envueltas xenotrópicas, politrópicas o anfotrópicas, tales como la envuelta del virus Sindbis, GALV o VSV-G.

En algunos casos que se divulgan 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 lentiviral. En algunos casos que se divulgan 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 lentiviral funcionales. En algunas divulgaciones, 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 que se divulgan en el presente documento, la estirpe celular de empaquetamiento expresa de manera estable la proteína o proteínas víricas. Por ejemplo, en algunas divulgaciones, puede construirse una estirpe celular de empaquetamiento que contiene el gag, pol, rev y/u otros genes estructurales, pero sin la LTR y componentes de empaquetamiento. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, una estirpe celular de empaquetamiento puede transfectarse transitoriamente con moléculas de ácido nucleico que codifican una o más proteínas víricas junto con el genoma del vector vírico que contiene una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína heteróloga y/o un ácido nucleico que codifica una glicoproteína de envuelta.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los vectores víricos y los plásmidos de empaquetamiento y/o auxiliares se introducen a través de transfección o infección en la estirpe celular de empaquetamiento. La estirpe celular de empaquetamiento produce partículas de vector vírico que contienen el genoma de vector vírico. Se conocen bien métodos de transfección o infección. Los ejemplos no limitantes incluyen fosfato de calcio, DEAE-dextrano y métodos de lipofección, electroporación y microinyección.

Cuando un plásmido recombinante y la LTR retroviral y las secuencias de empaquetamiento se introducen en una estirpe celular especial (por ejemplo, mediante precipitación de fosfato de calcio, por ejemplo), las secuencias de empaquetamiento pueden permitir que el transcrito de ARN del plásmido recombinante se empaquete en partículas víricas, que después pueden secretarse en el medio de cultivo. Después, el medio que contiene los retrovirus recombinantes en algunos casos que se divulgan en el presente documento se recoge, opcionalmente se concentra y se usa para la transferencia de genes. Por ejemplo, en algunas divulgaciones, después de 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 del medio de cultivo y se valoran mediante métodos convencionales utilizados por los expertos en la materia.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, puede producirse un vector retroviral, tal como un vector lentiviral, 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 que se divulgan en el presente documento, una célula de empaquetamiento se transfecta 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 que se divulgan en el presente documento, la estirpe celular de empaquetamiento

se transfecta opcional y/o adicionalmente con y/o contiene un polinucleótido que codifica una proteína rev. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la estirpe celular de empaquetamiento se transfecta opcional y/o adicionalmente con y/o contiene un polinucleótido que codifica una glicoproteína de envuelta no nativa, tal como VSV-G. En algunos de dichos casos que se divulgan 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 pueden recuperarse y valorarse.

Las partículas de vector retrovítico recuperadas y/o producidas pueden usarse para transducir células diana usando los métodos como se describen. Una vez en las células diana, el ARN vírico se transcribe inversamente, se importa en el núcleo y se integra de manera estable en el genoma del hospedador. Uno o dos días después de la integración del ARN vírico, puede detectarse la expresión de la proteína recombinante, por ejemplo, receptor de antígeno, tal como CAR.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos que se divulgan implican métodos de transducción de células poniendo en contacto, por ejemplo, incubando, una composición celular que comprende una pluralidad de células con una partícula vírica. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células que se han de 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 que se divulgan en el presente documento, la concentración de células que se han de transducir de la composición es de desde o de aproximadamente $1,0 \times 10^5$ células/ml a $1,0 \times 10^8$ células/ml, tal como al menos o aproximadamente al menos o aproximadamente $1,0 \times 10^5$ células/ml, 5×10^5 células/ml, 1×10^6 células/ml, 5×10^6 células/ml, 1×10^7 células/ml, 5×10^7 células/ml o 1×10^8 células/ml.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las partículas víricas se proporcionan en una determinada relación de copias de las partículas de vector vírico o unidades infecciosas (UI) de las mismas, por número total de células que se han de transducir (UI/célula). Por ejemplo, en algunos casos que se divulgan en el presente documento, las partículas víricas están presentes durante el contacto a exactamente o aproximadamente o al menos exactamente o aproximadamente 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 que se divulgan en el presente documento, el título de 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, 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 que se divulgan en el presente documento, la transducción puede conseguirse a una multiplicidad de infección (MOI, por sus siglas en inglés) de menos de 100, tal como generalmente menos de 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5 o menos.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el método implica poner en contacto o incubar, las células con las partículas víricas. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el contacto es durante 30 minutos a 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 que se divulgan en el presente documento, el contacto se realiza en solución. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células y las partículas víricas se ponen en contacto en un volumen de desde o de aproximadamente 0,5 ml a 500 ml, tal como desde 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 determinados casos que se divulgan en el presente documento, las células de entrada se tratan, se incuban o se ponen en contacto con partículas que comprenden moléculas de unión que se unen o reconocen el receptor recombinante que es codificado por el ADN vírico.

En algunos casos que se divulgan 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.

En algunos casos que se divulgan 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 que se divulgan en el presente documento, los ácidos nucleicos recombinantes se transfieren a los linfocitos T a través de transposición (véase, por ejemplo, Manuri *et al.* (2010) *Hum Gene Ther* 21(4): 427-437; Sharma *et al.* (2013) *Molec Ther Nucl Acids* 2, e74; y Huang *et al.* (2009) *Methods Mol Biol* 506: 115-126). Otros métodos de introducción y expresión de material genético en células

inmunitarias incluyen la transfección con fosfato de calcio (por ejemplo, como se describe en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y.), fusión de protoplastos, transfección mediada por liposomas catiónicos; bombardeo de micropartículas facilitado por partículas de wolframio (Johnston, *Nature*, 346: 776-777 (1990)); y coprecipitación de ADN 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 aquellos que se describen, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional, Publicación N.º: WO2014055668 y la Patente de los EE.UU. N.º 7.446.190.

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

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, puede usarse un vector que no requiera que las células, por ejemplo, linfocitos T, estén activadas. En algunos de dichos casos, las células pueden seleccionarse y/o transducirse antes de la activación. Por lo tanto, las células pueden modificarse por ingeniería genética antes o después del cultivo de las células y, en algunos casos, se divulgan en el presente documento al mismo tiempo que o durante al menos una porción del cultivo.

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

D. Cultivo, expansión y formulación de células modificadas por ingeniería genética

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos para generar las células modificadas por ingeniería genética, por ejemplo, para la terapia celular de acuerdo con cualquiera de los métodos, usos, artículos de fabricación o composiciones que se divulgan, incluyen una o más etapas para cultivar células, por ejemplo, cultivar células en condiciones que promueven la proliferación y/o expansión. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células se cultivan en condiciones que promueven la proliferación y/o expansión posterior a una etapa de modificación genética, por ejemplo, introducir un polipéptido recombinante en las células mediante transducción o transfección. En casos particulares que se divulgan en el presente documento, las células se cultivan después de que las células se hayan incubado en condiciones estimuladoras y se hayan transducido o transfectado con un polinucleótido recombinante, por ejemplo, un polinucleótido que codifica un receptor recombinante. Por lo tanto, en algunos casos que se divulgan en el presente documento, una composición de linfocitos T positivos para CAR que se ha modificado por ingeniería genética mediante transducción o transfección con un polinucleótido recombinante que codifica el CAR, se cultiva en condiciones que promueven la proliferación y/o expansión.

En determinados casos que se divulgan en el presente documento, la una o más composiciones de linfocitos T modificados por ingeniería genética son o incluyen dos composiciones separadas de linfocitos T enriquecidos, tales como dos composiciones separadas de linfocitos T enriquecidos que se han modificado por ingeniería genética con un polinucleótido que codifica un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR. En casos particulares que se divulgan en el presente documento, dos composiciones separadas de linfocitos T enriquecidos, por ejemplo, dos composiciones separadas de linfocitos T enriquecidos seleccionados, aislados y/o enriquecidos a partir de la misma muestra biológica, se cultivan por separado en condiciones estimuladoras, tal como posteriormente a una etapa de modificación genética, por ejemplo, introducir un polipéptido recombinante en las células mediante transducción o transfección. En determinados casos que se divulgan en el presente documento, las dos composiciones separadas incluyen una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos, tal como una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos que se han modificado por ingeniería genética con un polinucleótido que codifica un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR. En casos particulares que se divulgan en el presente documento, las dos composiciones separadas incluyen una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos, tal como una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos que

se han modificado por ingeniería genética con un polinucleótido que codifica un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, dos composiciones separadas de linfocitos T CD4+ enriquecidos y linfocitos T CD8+ enriquecidos, tal como una composición de linfocitos T CD4+ enriquecidos y una composición de linfocitos T CD8+ enriquecidos que se han modificado por ingeniería genética cada una por separado con un polinucleótido que codifica un receptor recombinante, por ejemplo, un CAR, se cultivan por separado, por ejemplo, en condiciones que promueven la proliferación y/o expansión.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el cultivo se realiza en condiciones que promueven la proliferación y/o expansión. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, dichas condiciones pueden diseñarse para inducir la proliferación, expansión, activación y/o supervivencia de células en la población. En casos particulares que se divulgan en el presente documento, las condiciones estimuladoras pueden incluir uno o más de medios particulares, temperatura, contenido de oxígeno, contenido de dióxido de carbono, tiempo, agentes, por ejemplo, nutrientes, aminoácidos, antibióticos, iones y/o factores estimuladores, tales como citocinas, quimiocinas, antígenos, compañeros de unión, proteínas de fusión, receptores solubles recombinantes y cualquier otro agente diseñado para promover el crecimiento, la división y/o la expansión de las células.

En casos particulares que se divulgan en el presente documento, las células se cultivan en presencia de una o más citocinas. En casos particulares que se divulgan en el presente documento, la una o más citocinas son citocinas recombinantes. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la una o más citocinas son citocinas recombinantes humanas. En determinados casos que se divulgan en el presente documento, la una o más citocinas se unen a y/o son capaces de unirse a receptores que se expresan por y/o son endógenos a los linfocitos T. En casos particulares que se divulgan en el presente documento, la una o más citocinas, por ejemplo, una citocina recombinante, es o incluye un miembro de la familia de citocinas de haces de 4 hélices alfa. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los miembros de la familia de citocinas de haces de 4-alfa-hélices incluyen, 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 estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la una o más citocinas recombinantes incluyen IL-2, IL-7 y/o IL-15. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células, por ejemplo, las células modificadas por ingeniería genética, se cultivan en presencia de una citocina, por ejemplo, una citocina humana recombinante, a una concentración de entre 1 UI/ml y 2.000 UI/ml, entre 10 UI/ml y 100 UI/ml, entre 50 UI/ml y 200 UI/ml, entre 100 UI/ml y 500 UI/ml, entre 100 UI/ml y 1.000 UI/ml, entre 500 UI/ml y 2.000 UI/ml o entre 100 UI/ml y 1.500 UI/ml.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el cultivo se realiza en condiciones que generalmente incluyen una temperatura adecuada para el crecimiento de células inmunitarias primarias, tales como linfocitos T humanos, por ejemplo, al menos aproximadamente 25 grados Celsius, generalmente al menos aproximadamente 30 grados y generalmente exactamente o aproximadamente 37 grados Celsius. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la composición de linfocitos T enriquecidos se incuba a una temperatura de 25 a 38 °C, tal como de 30 a 37 °C, por ejemplo, exactamente o aproximadamente 37 °C $\pm$ 2 °C. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la incubación se realiza durante un período de tiempo hasta que el cultivo, por ejemplo, siembra o expansión, da como resultado una densidad, un número o una dosis de células deseada o umbral. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la incubación es superior a o superior a aproximadamente o es durante aproximadamente o 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días o más.

En casos particulares que se divulgan en el presente documento, la siembra se realiza en un sistema cerrado. En determinados casos que se divulgan en el presente documento, la siembra se realiza en un sistema cerrado en condiciones estériles. En casos particulares que se divulgan en el presente documento, la siembra se realiza en el mismo sistema cerrado que una o más etapas de los sistemas que se divulgan. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la composición de linfocitos T enriquecidos se retira de un sistema cerrado y se coloca en y/o se conecta a un biorreactor para el cultivo. Los ejemplos de biorreactores adecuados para la siembra incluyen, pero sin limitación, GE Xuri W25, GE Xuri W5, Sartorius BioSTAT RM 20 | 50, Finesse SmartRocker Bioreactor Systems y Pall XRS Bioreactor Systems. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el biorreactor se usa para profundir y/o mezclar las células durante al menos una porción de la etapa de siembra.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la mezcla es o incluye balanceo y/o movimiento. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el biorreactor puede estar sujeto a movimiento o balanceo, lo que, en algunas divulgaciones, puede aumentar la transferencia de oxígeno. El movimiento del biorreactor puede incluir, pero sin limitación, rotar a lo largo de un eje horizontal, rotar a lo largo de un eje vertical, un movimiento de balanceo a lo largo de un eje horizontal ladeado o inclinado del biorreactor o cualquier combinación de los mismos. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, al menos una porción de la incubación se realiza con balanceo. La velocidad de balanceo y el ángulo de balanceo pueden ajustarse para conseguir la agitación deseada. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el ángulo de balanceo es de 20°, 19°, 18°, 17°, 16°, 15°, 14°, 13°, 12°, 11°, 10°, 9°, 8°, 7°, 6°, 5°, 4°, 3°, 2° o 1°. En determinados casos que se divulgan en el presente documento, el ángulo de balanceo está entre 6-16°. En otros casos que se divulgan en el presente documento, el ángulo de balanceo está entre 7-16°. En otros casos que se divulgan en el presente documento, el ángulo de balanceo está entre 8-12°. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la tasa de balanceo es de 1, 2, 3, 4, 5,

6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 rpm. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la velocidad de balanceo está entre 4 y 12 rpm, tal como entre 4 y 6 rpm, inclusive.

- 5 En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el biorreactor mantiene la temperatura a exactamente o cerca de 37 °C y los niveles de CO₂ a exactamente o cerca del 5 % con un flujo de aire constante a, a aproximadamente, o al menos 0,01 l/min, 0,05 l/min, 0,1 l/min, 0,2 l/min, 0,3 l/min, 0,4 l/min, 0,5 l/min, 1,0 l/min, 1,5 l/min o 2,0 l/min o superior a 2,0 l/min. En determinados casos que se divulgan en el presente documento, al menos una porción de la siembra se realiza con perfusión, tal como con una tasa de 290 ml/día, 580 ml/día y/o 1160 ml/día, por ejemplo, dependiendo del momento con respecto al inicio de la siembra y/o la densidad de las células cultivadas.
- 10 En algunos casos que se divulgan en el presente documento, al menos una porción de la expansión del cultivo celular se realiza con un movimiento de balanceo, tal como en un ángulo de entre 5° y 10°, tal como 6°, a una velocidad de balanceo constante, tal como a una velocidad de entre 5 y 15 RPM, tal como 6 RMP o 10 RPM.
- 15 En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los métodos de fabricación, generación o producción de una terapia celular y/o células modificadas por ingeniería genética, de acuerdo con los métodos, usos o artículos de fabricación que se divulgan, pueden incluir la formulación de células, tal como la formulación de células modificadas genéticamente resultantes de las etapas de procesamiento antes o después de la incubación, modificación por ingeniería genética y siembra, y/o una o más de otras etapas de procesamiento como se describe. En algunos casos
- 20 que se divulgan en el presente documento, una o más de las etapas de procesamiento, incluyendo la formulación de células, puede realizarse en un sistema cerrado. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células se procesan en una o más etapas (por ejemplo, realizadas en la cámara de centrifuga y/o sistema cerrado) para la fabricación, generación o producción de una terapia celular y/o las células modificadas por ingeniería genética pueden incluir la formulación de células, tal como la formulación de células modificadas genéticamente resultantes de las etapas de procesamiento antes o después del cultivo, por ejemplo, siembra y expansión, y/o una o más de otras etapas de procesamiento como se describe. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células
- 25 modificadas genéticamente se formulan como composiciones en forma de dosis unitaria que incluyen el número de células para la administración en una dosis dada o fracción de la misma.
- 30 En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosis de células que comprende células modificadas por ingeniería genética con un receptor de antígeno recombinante, por ejemplo, CAR o TCR, se proporciona como una composición o formulación, tal como una composición o formulación farmacéutica. Dichas composiciones pueden usarse de acuerdo con los métodos que se divulgan, tal como en el tratamiento de enfermedades, afecciones y trastornos, o en métodos y usos y artículos de fabricación de detección, diagnóstico y pronóstico. En algunos casos
- 35 que se divulgan en el presente documento, las células pueden formularse en una cantidad para la administración de la dosificación, tal como para la administración de dosificación unitaria única o la administración de dosificación múltiple.
- 40 En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células pueden formularse en un recipiente, tal como una bolsa o vial. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el vial puede ser un vial de infusión. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el vial se formula con una única dosis unitaria de las células modificadas por ingeniería genética, tal como que incluye el número de células para la administración en una dosis dada o fracción de la misma.
- 45 En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células se formulan en un tampón farmacéuticamente aceptable, que puede, en algunas divulgaciones, incluir un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el procesamiento incluye el intercambio de un medio en un medio o tampón de formulación que sea farmacéuticamente aceptable o deseado para la administración a un sujeto. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las etapas de procesamiento pueden implicar lavar las células transducidas y/o expandidas para reemplazar las células en un tampón farmacéuticamente aceptable que
- 50 puede incluir uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables opcionales. Ejemplos de dichas formas farmacéuticas, incluyendo vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables, pueden ser cualquiera de las que se describen a continuación junto con formas aceptables para administrar las células y composiciones a un sujeto. La composición farmacéutica en algunos casos que se divulgan en el presente documento contiene las células en cantidades eficaces para tratar o prevenir la enfermedad o afección, tal como una cantidad terapéuticamente eficaz o profilácticamente eficaz.
- 55 En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el tampón de formulación contiene un crioprotector. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células se formulan con una solución crioprotectora que contiene una solución de DMSO del 1,0 % al 30 %, tal como una solución de DMSO del 5 % al 20 % o una solución de DMSO del 5 % al 10 %. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la solución de crioprotección es o contiene, por ejemplo, PBS que contiene DMSO al 20 % y albúmina sérica humano (HSA) al 8 %, u otro medio de congelación celular adecuado. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la solución crioprotectora es o contiene, por ejemplo, DMSO al menos o aproximadamente al 7,5 %. En algunos casos
- 60 que se divulgan en el presente documento, las etapas de procesamiento pueden implicar lavar las células transducidas y/o expandidas para reemplazar las células en una solución crioprotectora. En algunos casos que se divulgan en el
- 65

presente documento, las células se congelan, por ejemplo, se crioprotegen o se crioconservan, en medio y/o solución con una concentración final de o de aproximadamente el 12,5 %, 12,0 %, 11,5 %, 11,0 %, 10,5 %, 10,0 %, 9,5 %, 9,0 %, 8,5 %, 8,0 %, 7,5 %, 7,0 %, 6,5 %, 6,0 %, 5,5 % o 5,0 % de DMSO, o entre el 1 % y el 15 %, entre el 6 % y el 12 %, entre el 5 % y el 10 %, o entre el 6 % y el 8 % de DMSO. En casos particulares que se divulgan en el presente documento, las células se congelan, por ejemplo, se crioprotegen o se crioconservan, en medio y/o solución con una concentración final de o de aproximadamente el 5,0 %, 4,5 %, 4,0 %, 3,5 %, 3,0 %, 2,5 %, 2,0 %, 1,5 %, 1,25 %, 1,0 %, 0,75 %, 0,5 % o 0,25 % de HSA, o entre el 0,1 % y el 5 %, entre el 0,25 % y el 4 %, entre el 0,5 % y el 2 %, o entre el 1 % y el 2 % de HSA.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la formulación se realiza usando una o más etapas de procesamiento que incluyen lavar, diluir o concentrar las células, tales como las células cultivadas o expandidas. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el procesamiento puede incluir la dilución o concentración de las células a una concentración o un número deseados, tales como composiciones en forma de dosis unitaria que incluyen el número de células para la administración en una dosis dada o fracción de la misma. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las etapas de procesamiento pueden incluir una reducción de volumen para aumentar de ese modo la concentración de células según se desee. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las etapas de procesamiento pueden incluir una adición de volumen para disminuir de ese modo la concentración de células según se desee. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el procesamiento incluye añadir un volumen de un tampón de formulación a las células transducidas y/o expandidas. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el volumen del tampón de formulación es de desde o de aproximadamente 10 ml a 1000 ml, tal como al menos o al menos aproximadamente o aproximadamente o 50 ml, 100 ml, 200 ml, 300 ml, 400 ml, 500 ml, 600 ml, 700 ml, 800 ml, 900 ml o 1000 ml.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, dichas etapas de procesamiento para formular una composición celular se realizan en un sistema cerrado. Los ejemplos de dichas etapas de procesamiento pueden realizarse usando una cámara centrífuga junto con uno o más sistemas o kits asociados a un sistema de procesamiento celular, tal como una cámara centrífuga producida y comercializada por Biosafe SA, incluyendo aquellas para su uso con los sistemas de procesamiento celular Sepax® o Sepax 2®. Un sistema y un proceso de ejemplo se describen en la Publicación Internacional Número WO2016/073602. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el método incluye efectuar la expresión desde la cavidad interna de la cámara centrífuga de una composición formulada, que es la composición resultante de células formuladas en un tampón de formulación, tal como un tampón farmacéuticamente aceptable, en cualquiera de los casos anteriores que se divulgan en el presente documento como se describe. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la expresión de la composición formulada es en un recipiente, tal como los viales de los recipientes de material biomédico que se describen en el presente documento, que está unido operativamente como parte de un sistema cerrado con la cámara centrífuga. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los recipientes de material biomédico están configurados para la integración y/o conexión operable y/o están integrados o conectados operativamente, a un sistema o dispositivo cerrado que lleva a cabo una o más etapas de procesamiento. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el recipiente de material biomédico está conectado a un sistema en una línea de salida o posición de salida. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el sistema cerrado está conectado al vial del recipiente de material biomédico en el tubo de entrada. Los sistemas de cierre de ejemplo para su uso con los recipientes de material biomédico que se describen en el presente documento incluyen el sistema Sepax® y Sepax® 2.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el sistema cerrado, tal como asociado a una cámara centrífuga o sistema de procesamiento celular, incluye un kit de salida de múltiples puertos que contiene un colector de tubos de múltiples vías asociado en cada extremo de una línea de tubos a un puerto al que se pueden conectar uno o una pluralidad de recipientes para la expresión de la composición formulada. En algunas divulgaciones, un número deseado o una pluralidad de viales, puede conectarse de manera estéril a uno o más, generalmente dos o más, tal como al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más de los puertos de la salida de múltiples puertos. Por ejemplo, en algunos casos que se divulgan en el presente documento, uno o más recipientes, por ejemplo, recipientes de material biomédico, pueden unirse a los puertos, o a menos de todos los puertos. Por lo tanto, en algunos casos que se divulgan en el presente documento, el sistema puede efectuar la expresión de la composición de salida en una pluralidad de viales de los recipientes de material biomédico.

En algunas divulgaciones, las células pueden expresarse en uno o más de la pluralidad de recipientes de salida, por ejemplo, viales, en una cantidad para la administración de dosificación, tal como para la administración de dosificación unitaria única o la administración de dosificación múltiple. Por ejemplo, en algunos casos que se divulgan en el presente documento, los viales, pueden contener cada uno el número de células para la administración en una dosis dada o fracción de la misma. Por lo tanto, cada vial, en algunas divulgaciones, puede contener una única dosis unitaria para su administración o puede contener una fracción de una dosis deseada de manera que más de uno de la pluralidad de viales, tal como dos de los viales, o 3 de los viales, juntos constituyen una dosis para la administración. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, 4 viales juntos constituyen una dosis para la administración.

Por lo tanto, los recipientes, por ejemplo, bolsas o viales, generalmente contienen las células que se han de

administrar, por ejemplo, una o más dosis unitarias de las mismas. La dosis unitaria puede ser una cantidad o número de las células que se han de administrar al sujeto o el doble del número (o más) de las células que se han de administrar. Puede ser la dosis más baja o la dosis más baja posible de las células que se administrarían al sujeto. En algunas divulgaciones, los artículos de fabricación que se divulgan incluyen uno o más de la pluralidad de recipientes de salida.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, cada uno de los recipientes, por ejemplo, bolsas o viales, comprende individualmente una dosis unitaria de las células. Por lo tanto, en algunos casos que se divulgan en el presente documento, cada uno de los recipientes comprende el mismo o aproximadamente o sustancialmente el mismo número de células. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, cada dosis unitaria contiene exactamente o aproximadamente o al menos o al menos aproximadamente 1×10^6 , 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 o 1×10^8 células modificadas por ingeniería genética, células totales, linfocitos T o PBMC. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, cada dosis unitaria contiene exactamente o aproximadamente o al menos o al menos aproximadamente 1×10^6 , 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 o 1×10^8 linfocitos T CAR+ que son CD3+, tal como CD4+ o CD8+, o un subconjunto viable de los mismos. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el volumen de la composición celular formulada en cada recipiente, por ejemplo, bolsa o vial, está entre exactamente o aproximadamente 10 ml y exactamente o aproximadamente 100 ml, tal como exactamente o aproximadamente o al menos o al menos aproximadamente 20 ml, 30 ml, 40 ml, 50 ml, 60 ml, 70 ml, 80 ml, 90 ml o 100 ml. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el volumen de la composición celular formulada en cada recipiente, por ejemplo, bolsa o vial, está entre exactamente o aproximadamente 1 ml y exactamente o aproximadamente 10 ml, tal como entre exactamente o aproximadamente 1 ml y exactamente o aproximadamente 5 ml. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el volumen de la composición celular formulada en cada recipiente, por ejemplo, bolsa o vial, está entre exactamente o aproximadamente 4 ml y exactamente o aproximadamente 5 ml. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el volumen de la composición celular formulada en cada recipiente, por ejemplo, bolsa o vial, es o es de aproximadamente 4,4 ml. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el volumen de la composición celular formulada en cada recipiente, por ejemplo, bolsa o vial, es o es de aproximadamente 4,5 ml. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el volumen de la composición celular formulada en cada recipiente, por ejemplo, bolsa o vial, es o es de aproximadamente 4,6 ml. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el volumen de la composición celular formulada en cada recipiente, por ejemplo, bolsa o vial, es o es de aproximadamente 4,7 ml. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el volumen de la composición celular formulada en cada recipiente, por ejemplo, bolsa o vial, es o es de aproximadamente 4,8 ml. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el volumen de la composición celular formulada en cada recipiente, por ejemplo, bolsa o vial, es o es de aproximadamente 4,9 ml. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el volumen de la composición celular formulada en cada recipiente, por ejemplo, bolsa o vial, es o es de aproximadamente 5,0 ml.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la composición celular formulada tiene una concentración de más de exactamente o aproximadamente $0,5 \times 10^6$ células que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR+)/CD3+ o dichas células viables por ml, más de exactamente o aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR+)/CD3+ o dichas células viables por ml, más de exactamente o aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR+)/CD3+ o dichas células viables por ml, más de exactamente o aproximadamente $2,0 \times 10^6$ células que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR+)/CD3+ o dichas células viables por ml, más de exactamente o aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR+)/CD3+ o dichas células viables por ml, más de exactamente o aproximadamente $2,6 \times 10^6$ células que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR+)/CD3+ o dichas células viables por ml, más de exactamente o aproximadamente $2,7 \times 10^6$ células que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR+)/CD3+ o dichas células viables por ml, más de exactamente o aproximadamente $2,8 \times 10^6$ células que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR+)/CD3+ o dichas células viables por ml, más de exactamente o aproximadamente $2,9 \times 10^6$ células que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR+)/CD3+ o dichas células viables por ml, más de exactamente o aproximadamente $3,0 \times 10^6$ células que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR+)/CD3+ o dichas células viables por ml, más de exactamente o aproximadamente $3,5 \times 10^6$ células que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR+)/CD3+ o dichas células viables por ml, más de exactamente o aproximadamente $4,0 \times 10^6$ células que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR+)/CD3+ o dichas células viables por ml, más de exactamente o aproximadamente $4,5 \times 10^6$ células que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR+)/CD3+ o dichas células viables por ml o más de exactamente o aproximadamente 5×10^6 células que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR+)/CD3+ o dichas células viables por ml. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células CD3+ son linfocitos T CD4+. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células CD3+ son linfocitos T CD8+. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los linfocitos T CD3+ son linfocitos T CD4+ y CD8+.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células en el recipiente, por ejemplo, bolsa o viales, puede criopreservarse. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el recipiente, por ejemplo, viales, puede almacenarse en nitrógeno líquido hasta su uso posterior.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, dichas células producidas mediante el método, o una

composición que comprende dichas células, se administran a un sujeto para tratar una enfermedad o afección, por ejemplo, de acuerdo con los métodos, usos y artículos de fabricación que se describen en el presente documento.

V. COMPOSICIONES Y FORMULACIONES

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosis de células que comprende células modificadas por ingeniería genética con un receptor de antígeno recombinante, por ejemplo, CAR o TCR, se proporciona como una composición o formulación, tal como una composición o formulación farmacéutica. Se han descrito anteriormente composiciones y formulaciones de ejemplo, incluyendo aquellas producidas en relación con métodos de modificación por ingeniería genética de las células. Dichas composiciones pueden usarse de acuerdo con los métodos o usos que se divulgan, y/o con los artículos de fabricación o composiciones que se divulgan, tal como en la prevención o el tratamiento de enfermedades, afecciones y trastornos, o en métodos de detección, diagnóstico y pronóstico.

La expresión "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que se encuentra en una forma que permite que la actividad biológica de un principio activo contenido en la misma sea eficaz, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se le administre la formulación.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" es un ingrediente de una formulación farmacéutica, distinto de un principio activo, que no es tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero sin limitación, un tampón, excipiente, estabilizante o conservante.

En algunas divulgaciones, la elección del vehículo está determinada en parte por la célula o agente particular y/o por el método de administración. En consecuencia, existe una diversidad de formulaciones adecuadas. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede contener conservantes. Los conservantes adecuados pueden incluir, por ejemplo, metilparabeno, propilparabeno, benzoato de sodio y cloruro de benzalconio. En algunas divulgaciones, se usa una mezcla de dos o más conservantes. El conservante o mezclas del mismo están normalmente presentes en una cantidad que está normalmente presente en una cantidad de aproximadamente el 0,0001 % a aproximadamente el 2 % en peso de la composición total. Los vehículos se describen, por ejemplo, en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16.ª edición, Osol, A. Ed. (1980). Los vehículos farmacéuticamente aceptables son generalmente no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen, pero sin limitación: tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilo amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; parabenos de alquilo tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, tales como polietilenglicol (PEG).

En algunas divulgaciones se incluyen agentes tamponantes en las composiciones. Los agentes tamponantes adecuados incluyen, por ejemplo, ácido cítrico, citrato de sodio, ácido fosfórico, fosfato de potasio y diversos otros ácidos y sales. En algunas divulgaciones, se usa una mezcla de dos o más agentes tamponantes. El agente tamponante o mezclas del mismo están normalmente presentes en una cantidad de aproximadamente el 0,001 % a aproximadamente el 4 % en peso de la composición total. Se conocen métodos para preparar composiciones farmacéuticas administrables. Se describen métodos de ejemplo en más detalle en, por ejemplo, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott Williams & Wilkins; 21.ª ed. (1 de mayo de 2005).

La formulación o composición también puede contener más de un principio activo útil para la indicación, enfermedad o afección particular que se previene o se trata con las células o agentes, donde las actividades respectivas no se afectan negativamente entre sí. Dichos principios activos están presentes de manera adecuada en combinaciones en cantidades que son eficaces para el fin previsto. Por lo tanto, en algunos casos que se divulgan en el presente documento, la composición farmacéutica incluye además otros agentes o fármacos farmacéuticamente activos, tales como agentes quimioterápicos, por ejemplo, asparaginasa, busulfán, carboplatino, cisplatino, daunorrubicina, doxorubicina, fluorouracilo, gemcitabina, hidroxiurea, metotrexato, paclitaxel, rituximab, vinblastina, vincristina, etc. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los agentes o células se administran en forma de sal, por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable. Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas derivadas de ácidos minerales, tales como ácido clorhídrico, bromhídrico, fosfórico, metafosfórico, nítrico y sulfúrico, y ácidos orgánicos, tales como ácidos tartárico, acético, cítrico, málico, láctico, fumárico, benzoico, glicólico, glucónico, succínico y arilsulfónico, por ejemplo, ácido p-toluenosulfónico.

La composición farmacéutica en algunos casos que se divulgan en el presente documento contiene agentes o células en cantidades eficaces para tratar o prevenir la enfermedad o afección, tal como una cantidad terapéuticamente eficaz o profilácticamente eficaz. La eficacia terapéutica o profiláctica en algunos casos que se divulgan en el presente documento se controla mediante la evaluación periódica de los sujetos tratados. Para administraciones repetidas a lo

largo de varios días o un período mayor, dependiendo de la afección, el tratamiento se repite hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de enfermedad. Sin embargo, pueden ser útiles y pueden determinarse otras pautas posológicas. La dosificación deseada puede suministrarse mediante una única administración en bolo de la composición, mediante múltiples administraciones en bolo de la composición, o mediante la administración por infusión continua de la composición.

Los agentes o células pueden administrarse por cualquier medio adecuado, por ejemplo, mediante infusión en bolo, mediante inyección, por ejemplo, inyecciones intravenosas o subcutáneas, inyección intraocular, inyección periocular, inyección subretiniana, inyección intravítrea, inyección trans-septal, inyección subescleral, inyección intracoroidal, inyección intracameral, inyección subconjetal, inyección subconjuntival, inyección subtenoniana, inyección retrobulbar, inyección peribulbar o suministro yuxtaescleral posterior. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, se administran por vía parenteral, por vía intrapulmonar e intranasal, y, si se desea para un tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, una dosis dada se administra mediante una única administración en bolo de las células o agente. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, se administra mediante múltiples administraciones en bolo de las células o agente, por ejemplo, durante un período de no más de 3 días, o mediante la administración por infusión continua de las células o agente.

Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosificación adecuada puede depender del tipo de enfermedad que ha de tratarse, del tipo de agente o agentes, del tipo de células o receptores recombinantes, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si el agente o las células se administran con fines preventivos o terapéuticos, la terapia anterior, los antecedentes clínicos del sujeto y la respuesta al agente o las células, y el criterio del médico especialista. En algunos casos, las composiciones que se describen en el presente documento se administran al sujeto de una sola vez o durante una serie de tratamientos.

Las células o agentes pueden administrarse usando técnicas, formulaciones y/o dispositivos de administración convencionales. Se divulgan formulaciones y dispositivos, tales como jeringas y viales, para el almacenamiento y la administración de las composiciones. Con respecto a las células, la administración puede ser autóloga o heteróloga. Por ejemplo, las células o progenitores inmunosensibles pueden obtenerse de un sujeto y administrarse al mismo sujeto o a un sujeto diferente, compatible. Las células inmunosensibles derivadas de sangre periférica o su progenie (por ejemplo, derivada *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*) pueden administrarse a través de inyección localizada, incluyendo administración por catéter, inyección sistémica, inyección localizada, inyección intravenosa o administración parenteral. Cuando se administra una composición terapéutica (por ejemplo, una composición farmacéutica que contiene una célula inmunosensible modificada genéticamente o un agente que trata o mejora los síntomas de la neurotoxicidad), generalmente se formulará en una forma farmacéutica inyectable unitaria (solución, suspensión, emulsión).

Las formulaciones incluyen aquellas para la administración oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, pulmonar, transdérmica, intramuscular, intranasal, bucal, sublingual o por supositorio. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente o las poblaciones celulares se administran por vía parenteral. El término "parenteral", como se usa en el presente documento, incluye la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, rectal, vaginal e intraperitoneal. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente o las poblaciones celulares se administran a un sujeto usando suministro sistémico periférico por inyección intravenosa, intraperitoneal o subcutánea.

En algunos casos, las composiciones que se divulgan en el presente documento se proporcionan como preparaciones líquidas estériles, por ejemplo, soluciones acuosas isotónicas, suspensiones, emulsiones, dispersiones o composiciones viscosas, que en algunas divulgaciones pueden tamponarse a un pH seleccionado. Las preparaciones líquidas son normalmente más fáciles de preparar que los geles, otras composiciones viscosas y composiciones sólidas. Adicionalmente, las composiciones líquidas son algo más cómodas de administrar, especialmente por inyección. Pueden formularse composiciones viscosas, por otro lado, dentro del intervalo de viscosidad adecuado para proporcionar períodos de contacto más largos con tejidos específicos. Las composiciones líquidas o viscosas pueden comprender vehículos, que puede ser un medio disolvente o de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido) y mezclas adecuadas de los mismos.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el agente o las células en un disolvente, tal como en mezcla con un vehículo, diluyente o excipiente adecuado tal como agua estéril, solución salina fisiológica, glucosa, dextrosa o similares.

Las formulaciones que se han de usar para la administración *in vivo* son generalmente estériles. La esterilidad puede lograrse fácilmente, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

VI. ARTÍCULOS DE FABRICACIÓN Y KITS

También se divulgan artículos de fabricación y kits que contienen células modificadas por ingeniería genética que expresan un receptor recombinante o composiciones de las mismas y, opcionalmente, instrucciones de uso, por ejemplo, instrucciones para la administración, de acuerdo con los métodos que se divulgan.

5 En algunos casos, en el presente documento se divulgan artículos de fabricación y/o kits que incluyen una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las células modificadas por ingeniería genética que se describen en el presente documento, e instrucciones para la administración, a un sujeto para tratar una enfermedad o afección. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las instrucciones pueden especificar algunos o todos los elementos de los métodos que se divulgan en el presente documento. En algunos
10 casos que se divulgan en el presente documento, las instrucciones especifican instrucciones particulares para la administración de las células para terapia celular, por ejemplo, dosis, momento, selección y/o identificación de sujetos para la administración y condiciones para la administración. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los artículos de fabricación y/o kits incluyen además uno o más agentes adicionales para terapia, por ejemplo, terapia de agotamiento linfóide y/o terapia de combinación, tal como cualquiera de los que se describen en el presente documento y, opcionalmente, incluye además instrucciones para administrar el agente adicional para terapia. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los artículos de fabricación y/o los kits comprenden además un agente para la terapia de agotamiento linfóide y, opcionalmente, incluyen además instrucciones para administrar la terapia de agotamiento linfóide. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las instrucciones pueden incluirse como una etiqueta o prospecto que acompaña a las composiciones
20 para la administración.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, dichos criterios incluyen sujetos que tienen CLL recidivante/refractaria y/o SLL o CLL de riesgo alto. En algunas divulgaciones, la población que ha de tratarse, por ejemplo, sujetos que tienen un Estado de Desempeño del Grupo de Oncología Cooperativo del Este (ECOG) que está
25 en cualquier lugar entre 0-1. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, de cualquiera de los casos que se divulgan en el presente documento, los sujetos que se han de tratar han fracasado en dos o más terapias anteriores.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las instrucciones especifican la dosis de células que se han de administrar. Por ejemplo, en algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosis especificada en las instrucciones incluye células que expresan un receptor recombinante (por ejemplo, CAR) total, tales como $2,5 \times 10^7$, 5×10^7 , o 1×10^8 de dichas células totales.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el artículo de fabricación o kit comprende un recipiente, opcionalmente un vial que comprende una pluralidad de linfocitos T CD4⁺ que expresan un receptor recombinante (por ejemplo, CAR) y un recipiente, opcionalmente un vial que comprende una pluralidad de linfocitos T CD8⁺ que expresan un receptor recombinante (por ejemplo, CAR). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el artículo de fabricación o kit comprende un recipiente, opcionalmente un vial que comprende una pluralidad de linfocitos T CD4⁺ que expresan un receptor recombinante, y además comprende, en el mismo recipiente, una pluralidad de linfocitos T CD8⁺ que expresan un receptor recombinante (por ejemplo, CAR). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, se incluye un crioprotector con las células. En algunas divulgaciones, el recipiente es una bolsa. en algunas divulgaciones, el recipiente es un vial.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el recipiente, tal como el vial, comprende más de exactamente o aproximadamente $0,5 \times 10^6$ células que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR⁺)/CD3⁺ o dichas células viables por ml, más de exactamente o aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR⁺)/CD3⁺ o dichas células viables por ml, más de exactamente o aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR⁺)/CD3⁺ o dichas células viables por ml, más de exactamente o aproximadamente $2,0 \times 10^6$ células que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR⁺)/CD3⁺ o dichas células viables por ml. más de exactamente o aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR⁺)/CD3⁺ o dichas células viables por ml, más de exactamente o aproximadamente $2,6 \times 10^6$ células que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR⁺)/CD3⁺ o dichas células viables por ml, más de exactamente o aproximadamente $2,7 \times 10^6$ células que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR⁺)/CD3⁺ o dichas células viables por ml, más de exactamente o aproximadamente $2,8 \times 10^6$ células que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR⁺)/CD3⁺ o dichas células viables por ml, más de exactamente o aproximadamente $2,9 \times 10^6$ células que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR⁺)/CD3⁺ o dichas células viables por ml más de exactamente o aproximadamente $3,0 \times 10^6$ células que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR⁺)/CD3⁺ o dichas células viables por ml, más de exactamente o aproximadamente $3,5 \times 10^6$ células que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR⁺)/CD3⁺ o dichas células viables por ml, más de exactamente o aproximadamente $4,0 \times 10^6$ células que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR⁺)/CD3⁺ o dichas células viables por ml, más de exactamente o aproximadamente $4,5 \times 10^6$ células que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR⁺)/CD3⁺ o dichas células viables por ml o más de exactamente o aproximadamente 5×10^6 células que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR⁺)/CD3⁺ o dichas células viables por ml. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células CD3⁺ son linfocitos T CD4⁺. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células CD3⁺ son linfocitos T CD8⁺. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los linfocitos T CD3⁺ son linfocitos T

CD4+ y CD8+.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la pluralidad de viales o pluralidad de células o dosis unitaria de células especificadas para la administración, en conjunto, comprende una dosis de células que comprende desde o de aproximadamente $2,5 \times 10^7$ a 5×10^7 linfocitos T que expresan receptores recombinantes totales o linfocitos T totales, o de 5×10^7 a 1×10^8 linfocitos T que expresan receptores recombinantes totales o linfocitos T totales. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los linfocitos T son células CD3+. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células CD3+ son linfocitos T CD8+. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los linfocitos T CD3+ son linfocitos T CD4+ y CD8+. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la pluralidad de viales o pluralidad de células o dosis unitaria de células especificadas para la administración incluyen una o más dosis unitarias de linfocitos T CD3+ CD4+ que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR) y una o más dosis unitarias de linfocitos T CD3+ CD8+ que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el número de células de cada dosis unitaria son células viables.

En algunas divulgaciones, el artículo comprende una o más dosis unitarias de las células CD4+ y CD8+ o de las células CD4+receptor+ (por ejemplo, CAR+) células y las células CD8+receptor+ (por ejemplo, CAR+), en donde la dosis unitaria comprende entre exactamente o aproximadamente 1×10^7 y exactamente o aproximadamente 2×10^8 linfocitos T que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR), entre exactamente o aproximadamente 5×10^7 y exactamente o aproximadamente $1,5 \times 10^8$ linfocitos T que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR), exactamente o aproximadamente 5×10^7 linfocitos T que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR), exactamente o aproximadamente 1×10^8 linfocitos T que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR) o exactamente o aproximadamente $1,5 \times 10^8$ linfocitos T que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR), opcionalmente en donde la información en el artículo especifica la administración de una o de una pluralidad de dosis unitarias y/o un volumen correspondiente a dicha una o pluralidad de dosis unitarias. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el artículo comprende una o más dosis unitarias de las células CD8+, en donde la dosis comprende entre exactamente o aproximadamente 5×10^6 y exactamente o aproximadamente 1×10^8 linfocitos T CD8+ que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR), la dosis comprende entre exactamente o aproximadamente 1×10^7 y exactamente o aproximadamente $0,75 \times 10^8$ linfocitos T CD8+ que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR), la dosis comprende exactamente o aproximadamente $2,5 \times 10^7$ linfocitos T CD8+ que expresan receptor recombinante (por ejemplo, CAR), o la dosis comprende exactamente o aproximadamente 5×10^7 linfocitos T CD8+ que expresan receptor recombinante (por ejemplo, CAR), o la dosis comprende exactamente o aproximadamente $0,75 \times 10^8$ linfocitos T CD8+ que expresan receptor recombinante (por ejemplo, CAR), opcionalmente en donde la información en el artículo especifica la administración de una o de una pluralidad de dosis unitarias y/o un volumen correspondiente a dicha una o pluralidad de dosis unitarias. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el artículo comprende una o más dosis unitarias de las células CD4+, en donde la dosis comprende entre exactamente o aproximadamente 5×10^6 y exactamente o aproximadamente 1×10^8 linfocitos T CD4+ que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR), la dosis comprende entre exactamente o aproximadamente 1×10^7 y exactamente o aproximadamente $0,75 \times 10^8$ linfocitos T CD4+ que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR), la dosis comprende exactamente o aproximadamente $2,5 \times 10^7$ linfocitos T CD4+ que expresan receptor recombinante (por ejemplo, CAR), o la dosis comprende exactamente o aproximadamente 5×10^7 linfocitos T CD4+ que expresan receptor recombinante (por ejemplo, CAR), o la dosis comprende exactamente o aproximadamente $0,75 \times 10^8$ linfocitos T CD4+ que expresan receptor recombinante (por ejemplo, CAR), opcionalmente en donde la información en el artículo especifica la administración de una o de una pluralidad de dosis unitarias y/o un volumen correspondiente a dicha una o pluralidad de dosis unitarias. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las células en el artículo, en conjunto, comprenden una dosis de células que comprende no más de exactamente o aproximadamente 1×10^8 linfocitos T que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR) totales o linfocitos T totales o células CD3+, no más de exactamente o aproximadamente 1×10^7 linfocitos T que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR) totales o linfocitos T totales o células CD3+, no más de exactamente o aproximadamente $0,5 \times 10^7$ linfocitos T que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR) totales o linfocitos T totales o células CD3+, no más de exactamente o aproximadamente 1×10^6 linfocitos T que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR) totales o linfocitos T totales o CD3+, no más de exactamente o aproximadamente $0,5 \times 10^6$ linfocitos T que expresan receptores recombinantes (por ejemplo, CAR) totales o linfocitos T totales o células CD3+. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el número de células de cada dosis unitaria son células viables.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, cada vial o la pluralidad de viales o pluralidad de células o dosis unitaria de células especificadas para la administración, en conjunto, comprende una dosis plana de células o una dosis fija de células de manera que la dosis de células no está vinculada o se basa en el área de superficie corporal o el peso de un sujeto.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, una dosis unitaria de una célula es o comprende el número o cantidad de células, tales como linfocitos T modificados por ingeniería genética, que puede administrarse a un sujeto o a un paciente en una única dosis. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la dosis unitaria es una fracción del número de células para la administración en una dosis dada.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las instrucciones para la administración de una dosis especifican administrar un número de células que comprende al menos o al menos aproximadamente $2,5 \times 10^7$ linfocitos T CD3+/CAR+, CD8+/CAR+ o CD4+/CD8+/CAR+, al menos o al menos aproximadamente 5×10^7 linfocitos T CD3+/CAR+, CD8+/CAR+ o CD4+/CD8+/CAR+, o al menos o al menos aproximadamente 1×10^8 linfocitos T CD3+/CAR+, CD8+/CAR+ o CD4+/CD8+/CAR+. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las instrucciones para la administración de una dosis especifican administrar un número de células que comprende exactamente o aproximadamente $2,5 \times 10^7$ linfocitos T CD3+/CAR+, CD8+/CAR+ o CD4+/CD8+/CAR+, exactamente o aproximadamente 5×10^7 linfocitos T CD3+/CAR+, CD8+/CAR+ o CD4+/CD8+/CAR+, o exactamente o aproximadamente 1×10^8 linfocitos T CD3+/CAR+, CD8+/CAR+ o CD4+/CD8+/CAR+. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el número de células es el número de dichas células que son células viables.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el artículo de fabricación o kit comprende una pluralidad de linfocitos T CD4+ que expresan un receptor recombinante e instrucciones para administrar, a un sujeto que tiene una enfermedad o afección, todos o una porción de la pluralidad de linfocitos T CD4+ y administrar además linfocitos T CD8+ que expresan un receptor recombinante. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las instrucciones especifican administrar los linfocitos T CD4+ antes de administrar las células CD8+. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las instrucciones especifican administrar los linfocitos T CD8+ antes de administrar las células CD4+. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el artículo de fabricación o kit comprende una pluralidad de linfocitos T CD8+ que expresan un receptor recombinante e instrucciones para administrar, a un sujeto que tiene una enfermedad o afección, todos o una porción de la pluralidad de linfocitos T CD8+ y linfocitos T CD4+ que expresan un receptor recombinante. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las instrucciones especifican la pauta posológica y el momento de la administración de las células.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las instrucciones para la administración de una dosis especifican administrar un número de células que es de exactamente o aproximadamente 5×10^7 células viables CD3+ CAR+, que incluye una dosis separada de exactamente o aproximadamente $2,5 \times 10^7$ células viables CD4+ CAR+ y exactamente o aproximadamente $2,5 \times 10^7$ células viables CD8+ CAR+. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las instrucciones para la administración de una dosis especifican administrar un número de células que es de exactamente o aproximadamente 1×10^8 células viables CD3+ CAR+, que incluye una dosis separada de exactamente o aproximadamente 5×10^7 células viables CD4+ CAR+ y exactamente o aproximadamente 5×10^7 células viables CD8+ CAR+. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las instrucciones para la administración de una dosis especifican administrar un número de células que es de exactamente o aproximadamente $1,5 \times 10^8$ células viables CD3+ CAR+, que incluye una dosis separada de exactamente o aproximadamente $0,75 \times 10^8$ células viables CD4+ CAR+ y exactamente o aproximadamente $0,75 \times 10^8$ células viables CD8+ CAR+.

En algunas divulgaciones, las instrucciones especifican administrar todo o una porción de los linfocitos T CD4+ y la totalidad o una porción de los linfocitos T CD8+ con 48 horas de diferencia, tal como no más de 36 horas de diferencia, no más de 24 horas de diferencia, no más de 12 horas de diferencia, tal como de 0 a 12 horas de diferencia, de 0 a 6 horas de diferencia o de 0 a 2 horas de diferencia. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las instrucciones especifican administrar los linfocitos T CD4+ y los linfocitos T CD8+ con no más de 2 horas, no más de 1 hora, no más de 30 minutos, no más de 15 minutos, no más de 10 minutos o no más de 5 minutos de diferencia. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las instrucciones especifican administrar los linfocitos T CD8+ antes que los linfocitos T CD4+.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los artículos de fabricación y/o kits incluyen además uno o más agentes adicionales para terapia, por ejemplo, terapia de agotamiento linfoide, como se describe en el presente documento, y opcionalmente instrucciones para administrar los agentes adicionales.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los artículos de fabricación y/o kits incluyen además uno o más agentes o tratamientos para tratar, prevenir, retrasar, reducir o atenuar el desarrollo o riesgo de desarrollo de una toxicidad y/o instrucciones para la administración de uno o más agentes o tratamientos para tratar, prevenir, retrasar, reducir o atenuar el desarrollo o riesgo de desarrollo de una toxicidad en el sujeto. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es o comprende un anticuerpo anti-IL-6 o un anticuerpo anti-receptor de IL-6. Por ejemplo, en algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente o tratamiento es o comprende un agente seleccionado de entre tocilizumab, siltuximab, clazakizumab, sarilumab, olokizumab (CDP6038), elsilimomab, ALD518/BMS-945429, sirukumab (CNTO 136), CPSI-2634, ARGX-109, FE301 y FM101. Por ejemplo, en algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente o tratamiento es o comprende uno o más de un esteroide; un antagonista o inhibidor de un receptor de citocinas o una citocina seleccionados de entre IL-10, IL-10R, IL-6, receptor de IL-6, IFN γ , IFNGR, IL-2, IL-2R/CD25, MCP-1, CCR2, CCR4, MIP1 β , CCR5, TNF α , TNFR1, IL-1 e IL-1R α /IL-1 β ; o un agente capaz de prevenir, bloquear o reducir la actividad o función de las células microgliales.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente capaz de prevenir, bloquear o reducir la actividad o función de las células microgliales se selecciona de un agente antiinflamatorio, un inhibidor de la NADPH oxidasa (NOX2), un bloqueante de los canales de calcio, un bloqueante de los canales de sodio, inhibe GM-CSF,

inhibe CSF1R, se une específicamente a CSF-1, se une específicamente a IL-34, inhibe la activación del factor nuclear kappa B (NF-κB), activa un receptor de CB₂ y/o es un agonista de CB₂, un inhibidor de fosfodiesterasa, inhibe el microARN-155 (miR-155) o regula positivamente el microARN-124 (miR-124). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente se selecciona de minociclina, naloxona, nimodipino, Riluzol, MOR103, lenalidomida, un cannabinoide (opcionalmente WIN55 o 212-2), inmunoglobulina intravenosa (IVIg), ibudilast, ácido nucleico bloqueado anti-miR-155 (LNA), MCS110, PLX-3397, PLX647, PLX108-D1, PLX7486, JNJ-40346527, JNJ28312141, ARRY-382, AC-708, DCC-3014, 5-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil) pirimidina-2,4-diamina (GW2580), AZD6495, Ki20227, BLZ945, emactuzumab, IMC-CS4, FPA008, LY-3022855, AMG-820 y TG-3003. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el agente es un inhibidor del receptor del factor 1 estimulante de colonias (CSF1R). Por ejemplo, el agente PLX-3397, PLX647, PLX108-D1, PLX7486, JNJ-40346527, JNJ28312141, ARRY-382, AC-708, DCC-3014, 5-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)pirimidina-2,4-diamina (GW2580), AZD6495, Ki20227, BLZ945 o una sal farmacéutica o profármaco del mismo; emactuzumab, IMC-CS4, FPA008, LY-3022855, AMG-820 y TG-3003 o es un fragmento de unión a antígeno de los mismos, o una combinación de cualquiera de los anteriores.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los artículos de fabricación y/o kits incluyen además uno o más reactivos para someter a ensayo muestras biológicas, por ejemplo, muestras biológicas de sujetos que son candidatos para la administración o a los que se les ha administrado la terapia y, opcionalmente, instrucciones para el uso de los reactivos o ensayos. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, la muestra biológica es o se obtiene de una muestra de sangre, plasma o suero. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los reactivos pueden usarse antes de la administración de la terapia celular o después de la administración de la terapia celular, con fines diagnósticos, para identificar sujetos y/o para evaluar resultados de tratamiento y/o toxicidades. Por ejemplo, en algunos casos que se divulgan en el presente documento, el artículo de fabricación y/o los kits contienen además reactivos para medir el nivel de biomarcadores particulares, por ejemplo, citocinas o analitos, que se asocian a toxicidad e instrucciones para la medición. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los reactivos incluyen componentes para realizar un ensayo *in vitro* para medir los biomarcadores (por ejemplo, analitos), tal como un inmunoensayo, un ensayo basado en aptámeros, un ensayo histológico o citológico, o un ensayo de nivel de expresión de ARNm. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el ensayo *in vitro* se selecciona de entre un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunotransferencia, inmunoprecipitación, radioinmunoensayo (RIA), inmunotinción, ensayo de citometría de flujo, resonancia de plasmón superficial (SPR), ensayo de quimioluminiscencia, inmunoensayo de flujo lateral, ensayo de inhibición y ensayo de aidez. En algunas divulgaciones, el reactivo es un reactivo de unión que se une específicamente a los biomarcadores (por ejemplo, analitos). En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el reactivo de unión es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un aptámero o una sonda de ácido nucleico.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, los artículos de fabricación y/o kits comprenden uno o más reactivos capaces de detectar uno o más analitos, e instrucciones para usar el reactivo para someter a ensayo una muestra biológica de un sujeto que es candidato para el tratamiento, en donde el uno o más analitos pueden ser TNF-alfa o IL-16. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, también se incluyen instrucciones para someter a ensayo la presencia o ausencia, el nivel, la cantidad o la concentración de un analito en el sujeto en comparación con un nivel umbral del analito. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las instrucciones especifican métodos para realizar la evaluación o el control de dichos analitos, por ejemplo, TNF-alfa o IL-16, de acuerdo con cualquiera de los métodos que se divulgan.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, se incluyen las instrucciones que especifican, si el nivel, cantidad o concentración del analito en la muestra es exactamente o superior a un nivel umbral para el analito, administrar al sujeto un agente u otro tratamiento capaz de tratar, prevenir, retrasar, reducir o atenuar el desarrollo o riesgo de desarrollo de una toxicidad (i) antes de, (ii) en uno, dos o tres días de, (iii) simultáneamente con y/o (iv) en la primera fiebre después de, el inicio de la administración de la terapia celular al sujeto. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las instrucciones especifican que si el nivel, cantidad o concentración del analito en la muestra es exactamente o superior a un nivel umbral para el analito, la terapia celular se administra al sujeto a una dosis reducida o a una dosis que no se asocia al riesgo de desarrollar toxicidad o toxicidad grave, o no se asocia al riesgo de desarrollar una toxicidad o toxicidad grave en la mayoría de los sujetos, y/o una mayoría de sujetos que tienen una enfermedad o condición que el sujeto tiene o se sospecha que tiene, después de la administración de la terapia celular. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las instrucciones especifican que si el nivel, cantidad o concentración del analito en la muestra es exactamente o superior a un nivel umbral para el analito, la terapia celular se administra en un entorno hospitalario y/o con admisión en el hospital durante uno o más días, opcionalmente en donde la terapia celular se ha de administrar de otro modo a los sujetos de forma ambulatoria o sin admisión en el hospital durante uno o más días.

En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las instrucciones para administrar la terapia celular especifican, si el nivel, cantidad o concentración del analito en la muestra, es inferior a un nivel umbral, administrar al sujeto la terapia celular, opcionalmente a una dosis no reducida, opcionalmente de forma ambulatoria o sin admisión en el hospital durante uno o más días. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las instrucciones para administrar la terapia celular especifican, si el nivel, cantidad o concentración del analito en la muestra, es inferior a un nivel umbral, antes o simultáneamente con la administración de la terapia celular y/o antes del desarrollo de un

signo o síntoma de una toxicidad distinta de la fiebre, un agente o tratamiento capaz de tratar, prevenir, retrasar o atenuar el desarrollo de la toxicidad no se administra al sujeto. En algunas divulgaciones, las instrucciones para administrar la terapia celular especifican que si el nivel, cantidad o concentración del analito en la muestra, es inferior a un nivel umbral, la administración de la terapia celular ha de administrarse o puede administrarse al sujeto en un entorno ambulatorio y/o sin admisión del sujeto en el hospital durante la noche o durante uno o más días consecutivos y/o es sin admisión del sujeto en el hospital durante uno o más días.

Los artículos de fabricación y/o kits pueden incluir además una terapia celular y/o incluir además instrucciones para su uso con, antes y/o en relación con el tratamiento con la terapia celular. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, las instrucciones se incluyen para administrar el agente y las instrucciones especifican que si el nivel, cantidad o concentración del analito en la muestra, es exactamente o superior a un nivel umbral, administrar al sujeto el agente. En algunas divulgaciones, las instrucciones especifican además administrar una terapia celular al sujeto, en donde la administración del agente ha de realizarse (i) antes de, (ii) en uno, dos o tres días de, (iii) simultáneamente con y/o (iv) en la primera fiebre después de, el inicio de la administración de la terapia celular al sujeto.

Los artículos de fabricación y/o kits pueden incluir un recipiente y una etiqueta o prospecto sobre o asociado al recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, bolsas de solución IV, etc. Los recipientes pueden formarse a partir de una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente, en algunos casos que se divulgan en el presente documento, contiene una composición que está sola o combinada con otra composición eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el recipiente tiene un puerto de acceso estéril. Los recipientes de ejemplo incluyen bolsas de solución intravenosa, viales, incluyendo aquellos con tapones perforables por una aguja para inyección, o frascos o viales para agentes administrados por vía oral. La etiqueta o el prospecto pueden indicar que la composición se usa para tratar una enfermedad o afección. El artículo de fabricación puede incluir (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en donde la composición incluye células modificadas por ingeniería genética que expresan un receptor recombinante; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en donde la composición incluye el segundo agente. En algunos casos que se divulgan en el presente documento, el artículo de fabricación puede incluir (a) un primer recipiente con una primera composición contenida en el mismo, en donde la composición incluye un subtipo de células modificadas por ingeniería genética que expresan un receptor recombinante; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en donde la composición incluye un subtipo diferente de células modificadas por ingeniería genética que expresan un receptor recombinante. El artículo de fabricación puede incluir además un prospecto que indica que las composiciones pueden usarse para tratar una afección particular. Como alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede incluir además otro o el mismo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable. Puede incluir además otros materiales tales como otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y/o jeringas.

VIII. DEFINICIONES

A menos que se definan de otra manera, todos los términos de la técnica, las notaciones y otros términos o terminología técnica y científica utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido habitualmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece la materia objeto reivindicada. En algunos casos, los términos con significados entendidos habitualmente se definen en el presente documento para mayor claridad y/o para facilitar la consulta, y la inclusión de dichas definiciones en el presente documento no debe interpretarse necesariamente como una diferencia sustancial con respecto a lo que se entiende generalmente en la técnica.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente para referirse a un polímero de restos de aminoácidos, y no se limitan a una longitud mínima. Los polipéptidos, incluyendo los receptores proporcionados y otros polipéptidos, por ejemplo, enlazadores o péptidos, puede incluir restos de aminoácidos que incluyen restos de aminoácidos naturales y/o no naturales. Los términos también incluyen modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilación, sialilación, acetilación y fosforilación. 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 a través de mutagénesis dirigida al sitio, o puede ser accidental, tal como a través de mutaciones de hospedadores que producen las proteínas o errores debido a la amplificación por PCR.

Como se usa en el presente documento, un "sujeto" es un mamífero, tal como un ser humano u otro animal, y normalmente es un ser humano. En algunas realizaciones, el sujeto, por ejemplo, paciente, a quien se le administra el agente o agentes, las células, las poblaciones celulares o composiciones, es un mamífero, normalmente un primate, tal como un ser humano. En algunas realizaciones, el primate es un mono o un simio. El sujeto puede ser hombre o mujer y puede tener cualquier edad adecuada, incluyendo sujetos bebés, niños, adolescentes, adultos y geriátricos. En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero no primate, tal como un roedor.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y variaciones gramaticales del mismo, tales como "trata" o "tratar") se refiere a la mejora o reducción completa o parcial de una enfermedad o afección o trastorno, o un síntoma,

efecto o resultado adverso, o fenotipo asociado al mismo. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero sin limitación, prevenir la aparición o reaparición de la enfermedad, el alivio de los síntomas, la disminución de cualesquiera consecuencias patológicas directas o indirectas de la enfermedad, prevenir la metástasis, disminuir la velocidad de progresión de la enfermedad, la mejora o paliación de la patología y remisión o pronóstico mejorado. Los términos no implican la curación completa de una enfermedad o la eliminación completa de cualquier síntoma o efecto o efectos en todos los síntomas o resultados.

Como se usa en el presente documento, "retrasar de desarrollo de una enfermedad" significa diferir, impedir, ralentizar, retardar, estabilizar, suprimir y/o posponer el desarrollo de la enfermedad (tal como el cáncer). Este retraso puede ser de diferentes periodos de tiempo, dependiendo de la historia de la enfermedad y/o del individuo que se está tratando. En algunas realizaciones, un retraso suficiente o significativo puede, en efecto, incluir la prevención, en el sentido de que el individuo no desarrolla la enfermedad. Por ejemplo, un cáncer en estadio tardío, tal como el desarrollo de metástasis, puede retrasarse.

"Prevenir", como se usa en el presente documento, incluye proporcionar profilaxis con respecto a la aparición o reaparición de una enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad, pero al que aún no se le ha diagnosticado la enfermedad. En algunas realizaciones, las células y composiciones proporcionadas se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o ralentizar la progresión de una enfermedad.

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

Una "cantidad eficaz" de un agente, por ejemplo, una formulación farmacéutica, célula o composición, en el contexto de la administración, se refiere a una cantidad eficaz, en las dosificaciones/cantidades y durante los periodos de tiempo necesarios, para conseguir un resultado deseado, tal como un resultado terapéutico o profiláctico.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente, por ejemplo, una formulación farmacéutica o células, se refiere a una cantidad eficaz, en las dosificaciones y durante los periodos de tiempo necesarios, para conseguir un resultado terapéutico deseado, tal como para el tratamiento de una enfermedad, afección o trastorno, y/o un efecto farmacocinético o farmacodinámico del tratamiento. La cantidad terapéuticamente eficaz puede variar de acuerdo con factores tales como la patología, la edad, el sexo y el peso del sujeto, y las poblaciones de células administradas. En algunas realizaciones, los métodos proporcionados implican administrar las células y/o composiciones en cantidades eficaces, por ejemplo, cantidades terapéuticamente eficaces.

Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad que es eficaz, en las dosificaciones y durante los periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Normalmente, pero no necesariamente, puesto que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes de o en un estadio más precoz de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz. En el contexto de una menor carga tumoral, la cantidad profilácticamente eficaz en algunos aspectos será superior a la cantidad terapéuticamente eficaz.

El término "aproximadamente", como se usa en el presente documento, se refiere al intervalo de error habitual para el valor respectivo fácilmente conocido por el experto en este campo técnico. La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) realizaciones que se dirigen a ese valor o parámetro en sí.

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

A lo largo de la presente divulgación, diversos aspectos de la materia objeto reivindicada se presentan en un formato de intervalo. Debería entenderse que la descripción en formato de intervalo es meramente por comodidad y brevedad y no debería interpretarse como una limitación inflexible en el alcance de la materia objeto reivindicada. En consecuencia, se debe considerar que la descripción de un intervalo ha divulgado específicamente todos los posibles subintervalos, así como 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 indicado o intermedio en ese intervalo indicado queda abarcado dentro de la materia objeto reivindicada. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden estar incluidos independientemente en los intervalos más pequeños, y también quedan abarcados dentro de 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 están incluidos en la materia objeto reivindicada. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

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, acuosos, no acuosos o cualquier combinación de los mismos.

Como se usa en el presente documento, "enriquecimiento" cuando se refiere a uno o más tipos celulares o poblaciones celulares particulares, se refiere a aumentar el número o porcentaje del tipo o población celular, por ejemplo, en comparación con el número total de células en la composición o el volumen de la misma, o con respecto a otros tipos de células, tal como mediante selección positiva basada en marcadores expresados por la población o célula, o mediante selección negativa basada en un marcador no presente en la población celular o célula que se ha de agotar. La expresión no requiere la retirada completa de otras células, tipo celular o poblaciones de la composición y no requiere que las células enriquecidas de este modo estén presentes en o incluso cerca del 100 % en la composición enriquecida.

Como se 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, normalmente un marcador de superficie. Cuando se hace referencia a un marcador de superficie, la expresión se refiere a la presencia de expresión superficial detectada mediante citometría de flujo, por ejemplo, tiñendo con un anticuerpo que se une específicamente al marcador y detectando dicho anticuerpo, en donde la tinción es detectable mediante citometría de flujo a un nivel sustancialmente superior a la tinción detectada realizando el mismo procedimiento con un control emparejado por isotipo o control de activación de fluorescencia menos uno (FMO) en condiciones idénticas y/o a un nivel sustancialmente similar a aquel para 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 de células es "negativa" para un marcador particular se refiere a la ausencia de la presencia detectable sustancial sobre o en la célula de un marcador particular, normalmente un marcador de superficie. Cuando se hace referencia a un marcador de superficie, la expresión se refiere a la ausencia de expresión superficial detectada mediante citometría de flujo, por ejemplo, tiñendo con un anticuerpo que se une específicamente al marcador y detectando dicho anticuerpo, en donde la tinción no se detecta mediante citometría de flujo a un nivel sustancialmente superior a la tinción detectada realizando el mismo procedimiento con un control emparejado por isotipo o control de activación de fluorescencia menos uno (FMO) en condiciones idénticas y/o a un nivel sustancialmente inferior a aquel para una célula que se sabe que es positiva para el marcador, y/o a un nivel sustancialmente similar en comparación con el de una célula que se sabe que es negativa para el marcador.

El término "vector", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de propagar otro ácido nucleico al que se une. 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 los ácidos nucleicos a los que están unidos operativamente. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión".

A menos que se definan de otra manera, todos los términos de la técnica, las notaciones y otros términos o terminología técnica y científica utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido habitualmente en la materia a la que pertenece la materia objeto reivindicada. En algunos casos, los términos con significados entendidos habitualmente se definen en el presente documento para mayor claridad y/o para facilitar la consulta, y la inclusión de dichas definiciones en el presente documento no debe interpretarse necesariamente como una diferencia sustancial con respecto a lo que se entiende generalmente.

Los encabezamientos de sección utilizados en el presente documento tienen fines organizativos únicamente y no deben considerarse limitantes de la materia objeto que se describe.

IX. EJEMPLOS

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

Ejemplo 1: Administración de células que expresan CAR anti-CD19 a sujetos con leucemia linfocítica crónica (CLL) o linfoma linfocítico de células pequeñas (SLL) recidivantes y refractarios

Se administraron composiciones de linfocitos T CAR⁺ terapéuticas que contenían linfocitos T autólogos que expresaban un receptor de antígeno quimérico (CAR) específico para CD19 a sujetos humanos con leucemia linfocítica crónica (CLL) o linfoma linfocítico de células pequeñas (SLL).

Los sujetos tenían más de o al menos dieciocho años y tenían un diagnóstico de CLL o SLL. El diagnóstico de CLL fue con indicación de tratamiento basado en las directrices del Taller Internacional sobre Leucemia Linfocítica Crónica (iwCLL, por sus siglas en inglés) y la enfermedad medible clínicamente (afectación de la médula ósea por > 30 % de linfocitos, linfocitosis de sangre periférica > 5×10⁹/l, y/o ganglios linfáticos medibles y/o hepática o esplenomegalia. El diagnóstico de SLL se basó en la linfadenopatía y/o esplenomegalia y < 5×10⁹ linfocitos B clonales CD19⁺ CD5⁺/l [<

5000/ μ l] en la sangre periférica en el momento del diagnóstico con enfermedad medible definida como al menos una lesión > 1,5 cm en el diámetro transversal mayor, y que es SLL comprobado por biopsia.

Los sujetos no eran elegibles para el tratamiento con inhibidor de la tirosina cinasa de Bruton (BTKi, por ejemplo, ibrutinib) debido a un requisito de anticoagulación de dosis completa o antecedentes de arritmia, o había fracasado en el tratamiento después de haber recibido anteriormente BTKi según se determina por enfermedad estable (SD, por sus siglas en inglés) o enfermedad progresiva (PD, por sus siglas en inglés) como mejor respuesta, PD después de una respuesta anterior o interrupción debido a intolerancia (por ejemplo, toxicidad inmanejable). Más específicamente, los sujetos eran elegibles si tenían una enfermedad de riesgo alto (según se determina por anomalías citogenéticas complejas (por ejemplo, cariotipo complejo), del(17p), mutación TP53, IGVH sin mutación) y habían fracasado con más de o igual a (por ejemplo, al menos) 2 terapias anteriores; o si tenían enfermedad de riesgo normal y habían fracasado con más de o igual a (por ejemplo, al menos) 3 terapias anteriores. Los sujetos con enfermedad del SNC activa no tratada, ECOG >1 o transformación de Richter, se excluyeron.

A. Tratamiento

A los sujetos elegibles se les administraron las composiciones de linfocitos T terapéuticos anti-CD19. Las composiciones de linfocitos T terapéuticos administradas se habían generado mediante un proceso que incluía el enriquecimiento basado en inmunofluorescencia (por ejemplo, selección inmunomagnética) de células CD4⁺ y CD8⁺ de muestras de leucóforésis de los sujetos individuales que se iban a tratar. Los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ aislados se activaron por separado y se transdujeron independientemente con un vector vírico (por ejemplo, vector lentivírico) que codificaba un CAR anti-CD 19, seguido de una expansión y una criopreservación separadas de las poblaciones de células modificadas por ingeniería genética en un volumen bajo. El CAR contenía un scFv anti-CD 19 derivado de un anticuerpo murino (región variable derivada de FMC63, orientación VL-enlazador-VH), un espaciador derivado de inmunoglobulina, un dominio transmembranario derivado de CD28, una región coestimuladora derivada de 4-1BB y un dominio de señalización intracelular de CD3-zeta. El vector vírico contenía además secuencias que codificaban un receptor truncado, que sirvió como marcador sustituto para la expresión de CAR; separado de la secuencia CAR por un ribosoma T2A en dirección 3' de la secuencia.

Las composiciones celulares criopreservadas se descongelaron antes de la administración intravenosa. La dosis de linfocitos T terapéuticos se administró como una composición celular definida mediante la administración de una población de células CAR⁺ CD4⁺ formulada y una población de CAR⁺ CD8⁺ formulada administrada en una relación objetivo de aproximadamente 1:1.

A los sujetos se les administró una dosis única de linfocitos T que expresaban CAR (cada dosis única a través de infusiones separadas de linfocitos T CD4⁺ que expresaban CAR y linfocitos T que expresaban CAR CD8⁺, respectivamente) de la siguiente manera: una dosis única de nivel de dosis 1 (ND-1) que contenía 5×10^7 linfocitos T que expresaban CAR totales o una dosis única de nivel de dosis 2 (ND-2) que contenía 1×10^8 linfocitos T que expresaban CAR totales. En caso necesario, el nivel de dosis se reduce a $2,5 \times 10^7$ linfocitos T CAR⁺. El aumento de dosis siguió un algoritmo de intervalo de probabilidad de toxicidad modificado 2 (mTIP1-2). Se evaluaron las toxicidades limitantes de la dosis (DLT) durante veintiocho días después de la administración.

Antes de la infusión de linfocitos T CAR⁺, los sujetos recibieron una quimioterapia de agotamiento linfóide con fludarabina (flu, 30 mg/m²) y ciclofosfamida (Cy, 300 mg/m²) durante tres (3) días. Los sujetos recibieron linfocitos T que expresaban CAR después del agotamiento linfóide.

B. Evaluación de la respuesta

Se controló la respuesta de los sujetos al mes (treinta días) y tres meses después de la administración de los linfocitos T CAR⁺.

Las respuestas se evaluaron mediante los criterios de iwCLL (criterios de 2008: Hallek *et al.* *Blood* 2008; 111(12):5446-5456; criterios de 2018 Hallek *et al.*, *Blood* 2018 131 (25): 2745-2760), excepto por que la evaluación de eficacia inicial se realizó el Día 30. La respuesta se evaluó como remisión completa (CR), CR con recuperación de médula incompleta (CRI), PR de remisión parcial nodular (nPR), remisión parcial (PR), enfermedad estable o PD basándose en las directrices de iwCLL. nPR y PR se confirmaron con una evaluación repetida al menos ocho semanas después. La enfermedad también se evaluó con PET en el momento basal y después del tratamiento con linfocitos T que expresaban CAR de forma exploratoria como se indica en el esquema de acontecimientos.

Se realizó una evaluación de respuesta el día treinta después del tratamiento; dos meses (solo hematología), tres, seis, nueve, doce, dieciocho y veinticuatro (+ catorce días) o hasta PD, evidencia de progresión clínica, retirada del estudio o un requisito para una terapia alternativa. Las evaluaciones de eficacia incluyeron, según fue adecuado: Hematología (CBC con diferencial), CT (calidad de diagnóstico), PET, aspirado de médula ósea (BMA)/biopsia de médula ósea (BMB) (en la evaluación basal y en el día treinta, y posteriormente sólo si otros resultados fueron recientemente consistentes con CR, y en sujetos que no tenían evidencia de CLL en sangre periférica o médula, pero tenían PR basándose en linfadenopatía residual o esplenomegalia), evaluación de enfermedad mínima residual (MRD;

en sujetos que no tienen evidencia de CLL en sangre periférica o médula, es decir, CR o PR basadas en linfadenopatía residual o esplenomegalia).

La enfermedad residual mínima (MRD) se evaluó a 1×10^{-4} sensibilidad mediante citometría de flujo de seis colores usando sangre periférica y, para aquellos que eran indetectables por flujo, en la médula ósea a una sensibilidad de 1×10^{-6} usando secuenciación de última generación (NGS) mediante secuenciación profunda (adaptativa) clonoSEQ® de aspirados de médula ósea (BM).

Ejemplo 1.B.1

Los resultados se describen en este Ejemplo 1.B.1 para su evaluación en un ensayo clínico en curso. En este punto temporal de análisis, se evaluó una cohorte de diez (10) sujetos humanos adultos. Las características demográficas y de referencia de los sujetos de la cohorte se exponen en la **Tabla E1**.

Tabla E1: Características basales	
Característica	N = 10
Mediana de edad, años (intervalo)	64,5 (51-76)
Estadio, n (%)	
Estadio Rai III/IV	6 (60)
Estadio C de Binet	6 (60)
Citogenética de riesgo alto, n (%)	7 (70)
Del(17p), n (%)	4 (40)
mutación TP53, n (%)	5 (50)
IGHV sin mutación, n (%)	1 (10)
Cariotipo complejo, n (%)	4 (40)
Características de los pacientes	
Líneas de terapia anteriores, mediana (intervalo)	4 (3-8)
Ibrutinib anterior, n (%)	9 (90)
Progresión con ibrutinib y venetoclax anterior, ^a n (%)	6 (60)

Treinta días después de la dosis, seis de ocho sujetos (75 %) que eran evaluables para respuesta tenían una respuesta objetiva que incluía cuatro CR (50 %). Seis de siete sujetos (85,7 %) evaluables para enfermedad residual mínima (MRD) tenían enfermedad indetectable por flujo en la evaluación del día treinta. Cuatro de cinco sujetos evaluables para la respuesta a los tres meses después de la dosis tenían una respuesta en curso y uno progresó con la transformación de Richter. Los cuatro sujetos con respuesta en curso continuaron teniendo MRD indetectable mediante citometría de flujo tres meses después de la dosis. Las respuestas, incluyendo CR y respuestas de MRD indetectables, ocurrieron en sujetos con enfermedad de riesgo alto y con riesgo normal. Los análisis de médula ósea disponibles en clonoSEQ® respaldaron estas observaciones. Los resultados se resumen en la **Tabla E2**.

Tabla E2. Respuesta	
Respuesta, n (%)	Total (n = 8)
Respuesta global	6 (75)
CR	4 (50)
PR	2 (25)
SD	1 (12,5)
PD	1 (12,5)
MRD indetectable (10^{-4} sangre), n (%)	(n = 7)
MRD global indetectable	6 (85,7)
CR	3 (42,9)
PR	2 (28,6)
SD	1 (14,3)

Ejemplo 1.B.2

En un punto posterior en el tiempo en el estudio clínico que se describe en el Ejemplo 1.B.1 anterior, se analizaron los resultados. En este punto temporal de análisis, se evaluó una cohorte de dieciséis (16) sujetos humanos adultos con leucemia linfocítica crónica (CLL) recidivante o refractaria (R/R) que han fracasado o no son elegibles para la terapia con BTKi.

Las características demográficas y de referencia de los sujetos de la cohorte se exponen en la **Tabla E3**.

Tabla E3. Características basales	
Característica	N = 16
Mediana de edad, años (intervalo)	64,5 (51-76)
Hombre, n (%)	8 (50)

Estadio, n (%)	
Estadio Rai III/IV	10 (62,5)
Estadio C de Binet	10 (62,5)
Citogenética de riesgo alto (cualquiera), n (%)	12 (75)
Del (17p)	7 (43,8)
Mutación TP53	10 (62,5)
IGHV sin mutación	2 (12,5)
Cariotipo complejo	8 (50)
Características de los pacientes	
Líneas de terapia anteriores, mediana (intervalo)	4,5 (2-11)
Ibrutinib anterior, n (%)	16 (100)
Ibrutinib recidivante/refractario, n (%)	13 (81,3)
Progresión con ibrutinib y venetoclax anterior, ^a n (%)	8 (50)

Siete pacientes progresaron con venetoclax; 1 paciente tuvo la mejor respuesta de SD después de 3 meses de tratamiento.

Las tasas de respuesta se resumen en la **Tabla E4**. Para sujetos en todas las dosis, la mejor respuesta global observada fue una ORR del 81,3 % con una tasa de CR/RCi del 43,8 %. En este punto temporal en el estudio, la CR continuó en 5 de 6 pacientes con al menos 3 meses de seguimiento.

Tabla E4. Respuesta			
	Total	ND1	ND2
Mejor respuesta global, n (%)	(N = 16)	(N = 6)	(N = 10)
ORR	13 (81,3)	6 (100)	7 (70)
CR/RCi	7 (43,8)	5 (83,3)	2 (20)
PR/nPR	6 (37,5)	1 (16,7)	5 (50)
SD	2 (12,5)	0	2 (20)
PD	1 (6,3)	0	1 (10)
Respuesta a las 30 días después de la dosis, n (%)	(N = 16)	(N = 6)	(N = 10)
ORR	12 (75)	6 (100)	6 (60)
CR/RCi	5 (31,3)	3 (50,0)	2 (20,0)
PR/nPR	7 (43,8)	3 (50,0)	4 (40,0)
Respuesta a los 3 meses después de la dosis, n (%)	(N = 10)	(N = 6)	(N = 4)
ORR	8 (80,0)	5 (83,3)	3 (75,0)
CR/RCi	5 (50,0)	3 (50,0)	2 (50,0)
PR/nPR	3 (30,0)	2 (33,3)	1 (25,0)

Once de quince sujetos (73,3 %) tenían MRD indetectable (uMRD) en sangre mediante citometría de flujo el día treinta. Todos los sujetos continúan siendo indetectables en el último seguimiento en el último punto temporal evaluado en este estudio. Adicionalmente, los cinco pacientes que tuvieron un seguimiento de seis meses continuaron manteniendo la respuesta de uMRD (CR, n = 4 y PR, n = 1 según los criterios de iwCLL). Estos resultados se resumen en la **Tabla E5**.

Tabla E5. Enfermedad residual mínima: MRD indetectable en cualquier punto temporal			
Negatividad de MRD, n (%)	Total	ND1	ND2
	(N = 15)	(n = 6)	(n = 9)
Sangre periférica, flujo (10 ⁻⁴)	11 (73,3)	6 (100)	5 (55,6)
	(N = 8)	(n = 5)	(n = 3)
Médula ósea, NGS (10 ⁻⁴)	7 (87,5)	4 (80,0)	3 (100)

C. Evaluación de la seguridad

Se recogieron acontecimientos adversos (AA), acontecimientos adversos graves (SAE) y anomalías de laboratorio (tipo, frecuencia y gravedad). Los acontecimientos adversos de interés especial (AESI) incluyeron reacciones a la infusión, síndrome de liberación de citocinas (CRS), toxicidad neurológica, síndrome de activación de macrófagos (MAS) y síndrome de lisis tumoral (TLS).

Se evaluó la presencia o ausencia de acontecimientos adversos emergentes del tratamiento (TEAE) después de la administración de la terapia de linfocitos T-CAR. Se evaluó y controló a los sujetos para detectar neurotoxicidad (complicaciones neurológicas que incluyen síntomas de confusión, afasia, encefalopatía, crisis epilépticas mioclónicas, convulsiones, letargo y/o estado mental alterado), clasificada en una escala de 1-5, de acuerdo con la escala Criterios de Toxicidad Común del Instituto Nacional del Cáncer (CTCAE), versión 4.03 (NCI-CTCAE v4.03). Véase Terminología Común para Acontecimientos Adversos (CTCAE) Versión 4, Departamento de salud y servicios humanos de los Estados Unidos, Publicado: 28 de mayo de 2009 (v4.03: 14 de junio de 2010); y Guido Cavaletti y Paola Marmioli

Nature Reviews Neurology 6, 657-666 (Diciembre de 2010). Se determinó y controló el síndrome de liberación de citocinas (CRS), clasificado según la gravedad. Véase Lee *et al.*, *Blood*. 2014;124(2): 188-95. Las toxicidades limitantes de la dosis (DLT) se determinaron en los 28 días posteriores a la infusión de linfocitos T que expresaban CAR.

Ejemplo 1.C.1

El Ejemplo 1.C.1 describe AE basándose en el punto temporal de análisis en el Ejemplo 1.B.1. No se identificaron DLT. El síndrome de liberación de citocinas (CRS), la anemia, la trombocitopenia y la leucopenia fueron los acontecimientos adversos más comunes. Se informaron acontecimientos neurológicos (NE) en tres sujetos con frecuencia: Alteración de la concentración y afasia de grado 1, encefalopatía de grado 3 y afasia de grado 3. La mediana del tiempo hasta el inicio de CRS y NE fue 4,5 con un intervalo de 1-9 días, y 11 con un intervalo de 11-21 días, respectivamente. La mediana de duración de CRS y NE fue de 5,5 con un intervalo de 3-30 días, y 6 con un intervalo de 2-20 días, respectivamente. Seis sujetos recibieron tocilizumab y/o esteroides para el tratamiento de CRS y/o NE. EA graves de grados 3-4, se informaron en cinco sujetos con frecuencia. La **Tabla E6** representa el porcentaje de sujetos que se observó que habían experimentado TEAE.

Tabla E6. Evaluación de presencia o ausencia de TEAE para el ejemplo 1.B.1	
Acontecimiento adverso, n (%)	Total
Todos los acontecimientos de grado 3-4	9 (90)
Anemia	5 (50)
Leucopenia	5 (50)
Trombocitopenia	5 (50)
Neutropenia	4 (40)
Linfopenia	3 (30)
Todos los SAE	5 (50)
SAE de grado 3-4	5 (50)
Afasia	1 (10)
Disminución del fibrinógeno en sangre	1 (10)
Encefalopatía	1 (10)
Neutropenia febril	1 (10)
Hiponatremia	1 (10)
Infección pulmonar	2 (20)
Síndrome de liberación de citocinas	8 (80)
Acontecimientos de grado 3-4	0
Acontecimientos neurológicos	3 (30)
Acontecimientos de grado 3-4	2 (20)
DLT	0

Ejemplo 1.C.2

El Ejemplo 1.C.2 describe AE basándose en el punto temporal de análisis en el Ejemplo 1.B.2. **Tabla E7** resume los TEAE en los sujetos en este punto temporal (solo se muestran los EA graves relacionados después de noventa días). Se observó que los TEAE se produjeron en ≥ 20 % de los sujetos. Se notificó una DLT de hipertensión de grado 4 al ND2.

Tabla E7. Evaluación de presencia o ausencia de TEAE para el ejemplo 1.B.2			
	Todos los grados	Grado ≥ 3	Grado relacionado con el tratamiento ≥ 3
Cualquier TEAE, n (%)	16 (100)	16 (100)	9 (56,3)
Anemia	14 (87,5)	11 (68,8)	4 (25)
Trombocitopenia	13 (81,3)	12 (75)	5 (31,3)
Síndrome de liberación de citocinas	12 (75)	1 (6,3)	1 (6,3)
Neutropenia	10 (62,5)	10 (62,5)	6 (37,5)
Leucopenia	9 (56,3)	9 (56,3)	5 (31,3)
Hipocalcemia	8 (50)	0	0
Pirexia	6 (37,5)	0	0
Linfopenia	5 (31,3)	5 (31,3)	5 (31,3)
Náuseas	5 (31,3)	0	0
Diarrea	4 (25)	0	0
Neutropenia febril	4 (25)	3 (18,8)	1 (6,3)
Cefalea	4 (25)	0	0
Insomnio	4 (25)	0	0

Temblores	4 (25)	0	0
-----------	--------	---	---

La **Tabla E8** resume los SAE en sujetos en este punto temporal. Todos los SAE fueron de grado ≥ 3 . Se notificó una DLT de hipertensión de grado 4 al ND2.

Tabla E8. Evaluación de presencia o ausencia de SAE para el Ejemplo 1.B.2	
	Todos los pacientes (N = 16)
Cualquier SAE de cualquier grado, n (%)	7 (43,8)
Infección pulmonar	3 (18,8)
Afasia	1 (6,3)
Disminución del fibrinógeno en sangre	1 (6,3)
Encefalopatía	1 (6,3)
Neutropenia febril	1 (6,3)

5

(cont.)

Tabla E8. Evaluación de presencia o ausencia de SAE para el Ejemplo 1.B.2	
	Todos los pacientes (N = 16)
Hipertensión	1 (6,3)
Hiponatremia	1 (6,3)

No se observaron acontecimientos adversos de grado 4/5 de especial interés en ninguno de los sujetos en el análisis del Ejemplo 1.B.2. La **Tabla E9** resume la incidencia del síndrome de liberación de citocinas (CRS) y los acontecimientos adversos de neurotoxicidad en los sujetos. Como se muestra en la **Tabla E9**, se observaron tasas bajas de CRS de grado 3 (6,3 %) y acontecimientos neurológicos de grado 3 (18,8 %) en este punto temporal en el estudio.

10

Tabla E9. Evaluación de la presencia o ausencia de CRS y acontecimientos adversos de neurotoxicidad para el Ejemplo 1.B.2			
	Total (N = 16)	ND1 (N = 6)	ND2 (N = 10)
CRS - cualquier grado, n (%)	12 (75)	6 (100)	6 (60)
Mediana del tiempo hasta el primer inicio, d (intervalo)	6,5 (1-10)	6,5 (1-9)	5 (2-10)
Mediana de la duración, d (intervalo)	5,5 (2-30)	5,5 (3-30)	5,5 (2-13)
Grado 3	1 (6,3)	0	1 (10)
Acontecimientos neurológicos (NE)^a - cualquier grado, n (%)	6 (37,5)	2 (33,3)	4 (40)
Mediana del tiempo hasta el primer inicio, d (intervalo)	10 (4-21)	16 (11-21)	8 (4-11)
Mediana de la duración, d (intervalo)	6,5 (2-20)	4 (2-6)	8 (3-20)
Grado 3^b	3 (18,8)	2 (33,3)	1 (10)
Cualquiera, n (%)			
CRS o NE ^a	13 (81,3)	6 (100)	7 (70)
CRS o NE ^a	5 (31,3)	2 (33,3)	3 (30)
Uso de tocilizumab y/o dexametasona	11 (68,8)	4 (66,7)	7 (70)
Síndrome de lisis tumoral - cualquier grado, n (%)	2 (12,5)	1 (16,7)	1 (10)
Grado 3	2 (12,5)	1 (16,7)	1 (10)

^aLos acontecimientos neurológicos son acontecimientos relacionados con el tratamiento. Encefalopatía n = 2; afasia n = 1; estado confusional n = 1

D. Evaluación de linfocitos T CAR+ y análisis de citocinas

15

La farmacocinética sanguínea de los linfocitos T que expresan CAR se determinó usando citometría de flujo. Se evaluaron los perfiles de quimiocinas y citocinas solubles en suero para treinta y nueve analitos usando una plataforma de ensayo de electroquimioluminiscencia (por ejemplo, inmunoensayos V-PLEX (MSD)). Los analitos, incluyendo las citocinas, se midieron en los primeros treinta días de la administración de las composiciones terapéuticas de linfocitos T CAR+ anti-CD 19.

20

Ejemplo 1.D.1

Basándose en los datos del punto temporal que se describe en el Ejemplo 1.B.1 y 1.C.1, se realizó un análisis farmacocinético para evaluar el número de linfocitos T CAR+ en sangre periférica después del tratamiento. La mediana de dC_{máx} era 219 linfocitos T CAR+/μl con un intervalo de 0,35 a 583,46. La mediana del tiempo hasta la expansión máxima fue de 15,5 días con un intervalo de 13 a 19 días. La mediana del área bajo la curva (AUC) fue de 1528 células

25

por día/ μ l con un intervalo de 590 a 2847. En el único sujeto con una mejor respuesta de enfermedad progresiva, se observó expansión de células C CAR⁺ (FIG. 1). Los linfocitos T CAR⁺ persistieron en sujetos que mantuvieron su respuesta tres meses después de la dosis.

- 5 El análisis de suero mostró niveles elevados de múltiples biomarcadores, incluyendo CRP, IL-6, PLGF, IL-16 e IL-15 junto con CRS y NE.

Ejemplo 1.D.2

- 10 Basándose en los datos del punto temporal que se describe en el Ejemplo 1.B.2 y 1.C.2, se realizó un análisis farmacocinético para evaluar el número de linfocitos T CAR⁺ en sangre periférica hasta noventa días después de la administración. Como se muestra en la FIG. 2, los linfocitos T CAR⁺ persistieron en sujetos que mantuvieron su respuesta tres meses después de la administración.

- 15 El análisis de citocinas reveló IL-16 y TNF como biomarcadores potenciales de acontecimientos neurológicos de grado alto (FIG. 3A y 3B). De 38 citocinas evaluadas, se elevaron IL-16 y TNF en tres de los cuatro pacientes antes del primer inicio de acontecimientos neurológicos de grado 2 o 3 (Tabla E9).

Ejemplo 2: Evaluación adicional de la Respuesta, Seguridad, Farmacocinética, Farmacodinámica y Analitos sanguíneos en sujetos con leucemia linfocítica crónica (CLL) o linfoma linfocítico de células pequeñas (SLL) recidivantes y refractarios

- 20 Se evaluaron los resultados de respuesta, los resultados de seguridad, los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos y los analitos sanguíneos en sujetos en un punto posterior en el tiempo en el estudio clínico que se describe en el Ejemplo 1 anterior.

- 25 El análisis en este punto temporal presentado en este ejemplo se basa en un total de dieciséis sujetos a los que se les habían administrado las células que expresaban CAR anti-CD19. Los sujetos elegibles habían recibido dos o más líneas de terapia anteriores, incluyendo inhibidores de la tirosina cinasa de Bruton (BTKi), por ejemplo, ibrutinib, a menos que estuviese médicamente contraindicado, y tenían un estado de desempeño del Grupo Oncológico Cooperativo del Este (PS del ECOG) inferior o igual a 1. Después de tres días de quimioterapia de agotamiento linfóide, a los sujetos se les administró una dosis única de linfocitos T que expresaban CAR (cada dosis única a través de infusiones separadas de linfocitos T CD4⁺ que expresaban CAR y linfocitos T que expresaban CAR CD8⁺, respectivamente) de la siguiente manera: una dosis única de nivel de dosis 1 (ND-1) que contenía 5×10^7 linfocitos T que expresaban CAR totales ($n = 6$) o una dosis única de nivel de dosis 2 (ND-2) que contenía 1×10^8 linfocitos T que expresaban CAR totales ($n = 10$). La dosis de linfocitos T terapéuticos se administró como una composición celular definida mediante la administración de la población de células CAR⁺ CD4⁺ formulada y la población de CAR⁺ CD8⁺ formulada administrada en una relación objetivo de aproximadamente 1:1, como se describe en el Ejemplo 1.

- 40 Los sujetos se controlaron para determinar las toxicidades limitantes de la dosis (DLT) y la respuesta se evaluó mediante los criterios de iwCLL 2008. La enfermedad residual mínima se evaluó a una sensibilidad de 1×10^{-4} mediante citometría de flujo usando sangre periférica y en médula ósea a una sensibilidad de 1×10^{-6} usando secuenciación de última generación (NGS) mediante secuenciación profunda (adaptativa) clonoSEQ[®] de aspirados de médula ósea (BM).

- 45 En este punto temporal de análisis, el 75 % de los sujetos tenían características de riesgo alto, tal como la mutación TP53, cariotipo complejo, o del17p, el 100 % tenía BTKi anterior, por ejemplo, ibrutinib, terapia, y el 50 % tenía venetoclax anterior. La mediana del número de líneas de terapia anteriores fue de 4,5 (intervalo 2-11).

- 50 Hubo una toxicidad limitante de la dosis de hipertensión de grado (G) 4 en un sujeto al que se administró ND2. Los acontecimientos adversos emergentes del tratamiento de Grado 3/4 más comunes fueron citopenias (trombocitopenia, 75 %; anemia, 69 %; neutropenia, 63 %; leucopenia, 56%). Un sujeto tenía el síndrome de liberación de citocinas (CRS) G3 y tres sujetos tenían acontecimientos neurológicos (NE) G3.

- 55 De 15 sujetos evaluables, la mejor tasa de respuesta global (ORR) fue del 87 % (13/15), con un 83 % (5/6) de ORR a los seis meses. Siete sujetos (47 %) consiguieron una remisión completa (CR) con o sin recuperación completa del hemograma (CR/CRi).

- 60 Diez de quince sujetos (67 %) consiguieron enfermedad residual mínima indetectable (uMRD) en sangre el día 30 y se consiguió uMRD en siete de ocho sujetos (88 %) en aspirados de médula ósea. Se observaron CR negativas para MRD en sujetos que habían fracasado tanto con BTKi como con venetoclax. La mediana del tiempo hasta el nivel máximo de linfocitos T CAR⁺ en sangre fue de dieciséis días (intervalo 4-30).

- 65 Estos resultados demuestran que en sujetos muy pretratados con CLL/SLL de riesgo convencional y alto, incluyendo en sujetos que han recibido tratamiento previo con ibrutinib, las toxicidades (es decir, CRS y NE) después de la administración de una composición de linfocitos T CAR⁺ anti-CD19 fueron manejables. Además, de estos sujetos, se consiguieron rápidamente CR/CRi y/o uMRD.

Ejemplo 3: Administración de células que expresan Anti-CD19 a sujetos con leucemia linfocítica crónica (CLL) o linfoma linfocítico de células pequeñas (SLL) recidivantes y refractarios

5

Se administraron composiciones de linfocitos T CAR+ terapéuticas que contenían linfocitos T autólogos que expresaban un receptor de antígeno quimérico (CAR) específico para CD19 a sujetos humanos con leucemia linfocítica crónica (CLL) o linfoma linfocítico de células pequeñas (SLL) en un estudio clínico como se describe en los Ejemplos 1 y 2 anteriores. Los resultados de respuesta y los resultados de seguridad se evaluaron en sujetos en un punto posterior en el tiempo en el estudio clínico que se describe en los Ejemplos 1 y 2 anteriores. Las composiciones de linfocitos T-CAR terapéuticos anti-CD 19 se produjeron como se describe en el Ejemplo 1. La fabricación de la composición de linfocitos T terapéuticos anti-CD 19 no tuvo éxito para un sujeto.

El análisis en este punto temporal presentado en este ejemplo se basa en un total de 23 sujetos a los que se les habían administrado las células que expresaban CAR anti-CD 19 de acuerdo con la elegibilidad para el estudio clínico como se describe en el Ejemplo 1 y 2. Dos sujetos (9 %) fueron intolerantes a ibrutinib. Las características de referencia de los sujetos tratados se muestran en la **Tabla E10**.

Tabla E10: Características basales			
Característica	Todos los sujetos N = 23	ND1 n = 9	ND2 n = 14
Mediana de edad, años (intervalo)	66 (49-79)	67 (49-76)	66 (53-79)
Hombre, n (%)	11 (47,8)	4 (44,4)	7 (50,0)
Enfermedad voluminosa > 5 cm, n (%) ^a	8 (34,8)	3 (33,3)	5 (35,7)
SPD (cm ²), mediana (intervalo)	24,7 (2-197)	30,0 (2-119)	24,7 (5-197)
LDH (U/l), mediana (intervalo)	243 (119-634)	227 (174-634)	275 (119-527)
Terapia puente recibida, n (%)	17 (73,9)	5 (55,6)	12 (85,7)
Estadio, n (%)			
Estadio Rai III/IV	15 (65,2)	6 (66,7)	9 (64,3)
Estadio C de Binet	16 (69,6)	7 (77,8)	9 (64,3)
Citogenética de riesgo alto, n (%)	19 (82,6)	6 (66,7)	13 (92,9)
Del(17p), n (%)	8 (34,8)	3 (33,3)	5 (35,7)
mutación TP53, n (%)	14 (60,9)	4 (44,4)	10 (71,4)
Cariotipo complejo, n (%) ^b	11 (47,8)	5 (55,6)	6 (42,9)
Características de los pacientes			
Líneas de terapia anteriores, mediana (intervalo)	5 (2-11)	5 (3-8)	5 (2-11)
Ibrutinib anterior, n (%)	23 (100)	9 (100)	14 (100)
Ibrutinib recidivante/refractario, n (%)	21 (91,3)	9 (100)	12 (85,7)
Progresión con ibrutinib y venetoclax anterior, ^c n (%)	13 (56,5)	5 (55,6)	8 (57,1)
^a Enfermedad voluminosa definida como al menos una lesión de diámetro más largo > 5 cm.			
^b Al menos tres aberraciones cromosómicas.			
^c Doce sujetos progresaron con venetoclax; un sujeto tuvo la mejor respuesta de enfermedad estable después de tres meses de tratamiento.			

20

Los sujetos recibieron quimioterapia de agotamiento linfoide con fludarabina (flu, 30 mg/m²) y ciclofosfamida (Cy, 300 mg/m²) durante tres días antes de la infusión de linfocitos T CAR+. Las linfocitos T que expresaban CAR anti-CD19 se fabricaron con éxito para el 96 % de los sujetos. Las composiciones de células anti-CD19 crioconservadas se descongelaron antes de la administración intravenosa. A los sujetos se les administró una dosis única de linfocitos T que expresaban CAR (cada dosis única a través de una infusión separada de linfocitos T que expresaban CAR CD4+ y linfocitos T que expresaban CAR CD8+, respectivamente) de la siguiente manera: una dosis única de nivel de dosis 1 (ND-1) que contenía 5×10^7 linfocitos T que expresaban CAR totales (n = 9 sujetos) o una dosis única de nivel de dosis 2 (ND-2) que contenía 1×10^8 linfocitos T que expresaban CAR totales (n = 14 sujetos). La dosis de linfocitos T terapéuticos se administró como una composición celular definida mediante la administración de la población de células CAR+ CD4+ formulada y la población de CAR+ CD8+ formulada administrada en una relación objetivo de aproximadamente 1:1, como se describe en el Ejemplo 1. El aumento de dosis siguió un algoritmo de intervalo 2 de probabilidad de toxicidad modificado (mTPI-2) (Guo *et al.* (2017) *Contemp Clin Trials*, 2017; 58:23-33). Se evaluaron las toxicidades limitantes de la dosis (DLT) durante veintiocho días después de la administración.

35 A. Evaluación de la respuesta

Las respuestas se evaluaron mediante criterios de iwCLL como se describe en el Ejemplo 1 y 2. La enfermedad residual mínima se evaluó a una sensibilidad de 1×10^{-4} mediante citometría de flujo usando sangre periférica y en

médula ósea a una sensibilidad de 1×10^{-6} usando secuenciación de última generación (NGS) mediante secuenciación profunda (adaptativa) clonoSEQ® de aspirados de médula ósea (BM). Se controló la respuesta de los sujetos hasta veinticuatro meses después de la administración de los linfocitos T CAR+. La mediana de seguimiento del estudio fue de nueve meses, con un seguimiento mínimo de un mes.

Las tasas de respuesta se muestran en las **FIG. 4A-4B** y **FIG. 5**. Veintidós sujetos fueron evaluables para la respuesta definida como que tenían una evaluación pretratamiento y al menos una evaluación posterior al momento basal. Un sujeto no fue evaluable para respuesta. La mejor respuesta global se muestra en la **FIG. 4A**. Como se muestra en la **FIG. 4A**, del número total de sujetos evaluables, el 4,5 % demostró enfermedad progresiva, el 13,6 % demostró enfermedad estable, el 36,4 % demostró una respuesta parcial o una respuesta parcial nodular, y el 45,5 % demostró una respuesta completa o una respuesta completa con recuperación incompleta del hemograma. De los nueve sujetos evaluables a los que se les administró ND1 (5×10^7 linfocitos T que expresaban CAR), el 22,2% demostró enfermedad estable, el 11,1% demostró una respuesta parcial o una respuesta parcial nodular, y el 66,7% demostró una respuesta completa o una respuesta completa con recuperación incompleta del hemograma. De trece sujetos a los que se les administró ND2 (1×10^8 linfocitos T que expresaban CAR), el 7,7% demostró enfermedad progresiva, el 7,7% demostró enfermedad estable, el 53,8% demostró una respuesta parcial o una respuesta parcial nodular, y el 30,8% demostró una respuesta completa o una respuesta completa con recuperación incompleta del hemograma. La mejor tasa de respuesta global (ORR) fue del 82 % (intervalo de confianza del 95 %: 59,7-94,8), y tasa de CR/CRi del 46 % (un sujeto con MRD no evaluable consiguió una CR pero progresó más tarde). En un punto temporal de evaluación, el sesenta y ocho por ciento (15/22) de los sujetos consiguieron una respuesta objetiva el Día 30 después de la infusión. El 78 % (7/9) de los que respondieron con más de 9 meses de seguimiento posterior a la infusión permanecieron sin progresión.

Veinte sujetos fueron evaluables para la enfermedad residual mínima definida como que tenían una enfermedad residual mínima detectable en el momento basal (**FIG. 4B**). Como se muestra en la **FIG. 4B**, la enfermedad residual mínima indetectable (uMRD) se logró en el 75 % de la sangre periférica y el 65 % de la médula ósea de los sujetos (un sujeto consiguió uMRD en sangre/BM y después tuvo MRD detectable). De 8 sujetos a los que se administró ND1 (5×10^7 linfocitos T que expresaban CAR) se consiguió uMRD en el 75 % de la sangre periférica y la médula ósea. De 12 sujetos a los que se administró ND2 (1×10^8 linfocitos T que expresaban CAR), se consiguió uMRD en el 75 % de la sangre periférica y en el 58 % de la médula ósea.

La duración de la respuesta por tiempo sin progresión continuó mejorando con el tiempo (**FIG. 5**). De veintidós sujetos, el 27 % (6/22) demostró una profundización de la respuesta después del día treinta: 3 sujetos que presentaron respuesta parcial (PR) consiguieron posteriormente CR, 2 sujetos pasaron de enfermedad estable (SD) a PR, y 1 sujeto pasó de SD a CR. Cinco de seis sujetos, 83 %, con CR a los seis meses permaneció en CR, incluyendo tres sujetos que mantuvieron una respuesta completa más allá de los doce meses. Doce de veinte sujetos evaluables, el 60 % (12/20) tuvieron MRD indetectable mediante secuenciación de última generación el día treinta. La uMRD temprana observada en el 60 % de los sujetos estaba en curso a los 12 meses y en un punto de evaluación posterior.

B. Evaluación de la seguridad

La presencia o ausencia de acontecimientos adversos emergentes del tratamiento (TEAE) después de la administración de la terapia de linfocitos T-CAR anti-CD 19 se evaluó como se describe en el Ejemplo 1. Se notificaron TEAE en ≥ 25 % de los sujetos en todos los niveles de dosis (**Tabla E11**). En un punto temporal de evaluación, se observó anemia de grado 3 o 4 en el 96 % de los sujetos. Se produjeron TEAE graves en algunos sujetos (**Tabla E12**). La **Tabla E13** informa de la incidencia de determinados acontecimientos adversos, incluyendo el síndrome de liberación de citocinas (CRS) y acontecimientos neurológicos (NE). No se produjo CRS o NE de grado 5. Los acontecimientos neurológicos no fueron mutuamente excluyentes. Se observó encefalopatía en tres sujetos. Se observaron afasia, estado confuso, debilidad muscular y somnolencia cada uno en un sujeto. Se produjeron toxicidades limitantes de la dosis en dos sujetos que recibieron ND2 (1×10^8 linfocitos T que expresaban CAR). Un sujeto experimentó hipertensión de grado 4, mientras que un sujeto experimentó encefalopatía de grado 3, debilidad muscular de grado 3 y síndrome de lisis tumoral de grado 4. Se observó un TEAE de insuficiencia respiratoria de grado 5 en un sujeto al que se administró ND1 (5×10^7 linfocitos T que expresaban CAR). Para la gestión de CRS y/o NE, el 61 % (n = 14) de los sujetos recibió tocilizumab y el 48 % (n = 11) recibió corticoesteroides. Los acontecimientos adversos fueron manejables en ambos niveles de dosis, con tasas bajas de CRS de grado 3 (8,7 %) y NE de grado 3 o 4 (21,7 %). Las tasas más altas de CRS de grados 1-2 son coherentes con un perfil de seguridad favorable de la composición de linfocitos T CAR+ anti-CD 19 en este grupo de sujetos. Se demostró que la carga tumoral de los ganglios linfáticos se correlaciona con la NE (P = 0,025).

También se evaluaron los niveles de citocinas y quimiocinas en suero en los sujetos. El análisis de citocinas mostró que el inicio de NE fue precedido por TNF α e IL-16 elevados poco después de la infusión de linfocitos T que expresaban CAR anti-CD 19 (P < 0,01).

Tabla E11: Evaluación de presencia o ausencia de TEAE

	Todos los grados	Grado ≥ 3	ND1 Grado ≥ 3	ND2 Grado ≥ 3
	(N = 23)	(N = 23)	(n = 9)	(n = 14)

Cualquier TEAE, n (%)	23 (100,0)	22 (95,7)	8 (88,9)	14 (100)
Anemia	19 (82,6)	18 (78,3)	7 (77,8)	11 (78,6)
Síndrome de liberación de citocinas	17 (73,9)	2 (8,7)	0	2 (14,3)
Trombocitopenia	17 (73,9)	16 (69,6)	4 (44,4)	12 (85,7)
Neutropenia	13 (56,5)	13 (56,5)	4 (44,4)	9 (64,3)
Leucopenia	11 (47,8)	10 (43,5)	4 (44,4)	6 (42,9)
Hipocalcemia	9 (39,1)	0	0	0
Pirexia	9 (39,1)	0	0	0
Náuseas	8 (34,8)	0	0	0

(cont.)

Tabla E11: Evaluación de presencia o ausencia de TEAE				
	Todos los grados	Grado ≥ 3	ND1 Grado ≥ 3	ND2 Grado ≥ 3
	(N = 23)	(N = 23)	(n = 9)	(n = 14)
Diarrea	7 (30,4)	0	0	0
Hipofosfatemia	7 (30,4)	4 (17,4)	0	4 (28,6)
Temblor	7 (30,4)	0	0	0
Neutropenia febril	6 (26,1)	5 (21,7)	0	5 (35,7)
Hipomagnesemia	6 (26,1)	0	0	0
Linfopenia	6 (26,1)	6 (26,1)	2 (22,2)	4 (28,6)

Tabla E12: TEAE graves notificados en > 1 sujeto			
	Todos los sujetos	ND1	ND2
	(N = 23)	(n = 9)	(n = 14)
TEAE graves de cualquier grado, n (%)	13 (56,5)	4 (44,4)	9 (64,3)
Síndrome de liberación de citocinas	6 (26,1)	1 (11,1)	5 (35,7)
Pirexia	4 (17,4)	3 (33,3)	1 (7,1)
Encefalopatía	3 (13,0)	1 (11,1)	2 (14,3)
Neutropenia febril	3 (13,0)	0	3 (21,4)
Neumonía	3 (13,0)	2 (22,2)	1 (7,1)
Lesión renal aguda	2 (8,7)	2 (22,2)	0
Afasia	2 (8,7)	1 (11,1)	1 (7,1)
Infección pulmonar	2 (8,7)	1 (11,1)	1 (7,1)
Síndrome de lisis tumoral	2 (8,7)	0	2 (14,3)

Tabla E13: TEAE de interés especial			
	Total	ND1	ND2
	(N = 23)	(n = 9)	(n = 14)
CRS - cualquier grado, n (%)	17 (73,9)	7 (77,8)	10 (71,4)
Mediana del tiempo hasta el primer inicio, día (intervalo)	4 (1-10)	6 (1-9)	3,5 (1-10)
Mediana de la duración, día (intervalo)	5 (2-30)	5 (3-30)	5,5 (2-27)
Grado 3, n (%)	2 (8,7)	0	2 (14,3)
NE^a - cualquier grado, n (%)	9 (39,1)	2 (22,2)	7 (50,0)
Mediana del tiempo hasta el primer inicio, día (intervalo)	4,0 (2-21)	16 (11-21)	4 (2-11)
Mediana de la duración, día (intervalo)	21,0 (6-169)	8,5 (6-11)	38 (9-169)
Grado ≥ 3 , ^b n (%)	5 (21,7)	2 (22,2)	3 (21,4)
Cualquiera, n (%)			
CRS o NE ^a	18 (78,3)	7 (77,8)	11 (78,6)
CRS y NE ^a	8 (34,8)	2 (22,2)	6 (42,9)
Uso de tocilizumab y/o esteroides	17 (73,9)	5 (55,6)	12 (85,7)
Síndrome de lisis tumoral - cualquier grado, n (%)	4 (17,4)	1 (11,1)	3 (21,4)
Grado ≥ 3 , n (%)	4 (17,4)	1 (11,1)	3 (21,4)
Acontecimientos cardíacos, n (%)	1 (4,3)	1 (11,1)	0
^a NE son acontecimientos relacionados con el tratamiento			
^b NE no son mutuamente excluyentes			

C. Farmacocinética y farmacodinámica

La farmacocinética sanguínea de los linfocitos T que expresaban CAR anti-CD 19 se determinó usando citometría de flujo para evaluar el número de linfocitos T CD3⁺ CAR⁺ en sangre periférica después del tratamiento. Los resultados se muestran en la **FIG. 6** donde se administraron linfocitos T CAR⁺ anti-CD 19 el día 1 del estudio. En la **FIG. 6**, la barra de error superior representa el tercer cuartil y la barra de error inferior representa el primer cuartil. En la **Tabla E14** se muestra un resumen de los parámetros PK/PD, incluyendo la concentración máxima ($C_{\text{máx}}$) de células en la sangre, el tiempo para alcanzar la concentración máxima (pico) ($T_{\text{máx}}$) y el área bajo la curva (AUC).

Tabla E14: Perfil farmacocinético (PK) y farmacodinámico (PD)			
Mediana (Q1, Q3)	Total (N = 23)	ND1 (N = 9)	ND2 (N = 14)
$C_{\text{máx}}$ (células/ μ l)	125 (4,45, 320)	111 (325, 313)	130 (35,2, 305)
$T_{\text{máx}}$ (día de estudio)	15 (15,22)	15 (15,22)	15 (15,22)
ABC ₁₋₂₉ (día*células/ μ l)	1110 (34, 2120)	1080 (26,2, 1790)	1340 (215, 2230)

Los resultados fueron coherentes con una observación de que la respuesta objetiva, la respuesta completa y la uMRD se consiguieron rápidamente después de la infusión de linfocitos T que expresaban CAR anti-CD19, con respuestas duraderas observadas pasados 6 meses, para los sujetos muy pretratados con CLL/SLL recidivantes/refractarios (por ejemplo, incluyendo aquellos que habían recibido ibrutinib anterior y aquellos que han fracasado tanto con venetoclax como con ibrutinib anteriores) en un estudio clínico. Se observaron acontecimientos adversos asociados a la administración de linfocitos T que expresaban CAR anti-CD 19, incluyendo el síndrome de liberación de citocinas (CRS) y acontecimientos neurológicos (NE), que eran manejables en ambos niveles de dosis sometidos a ensayo.

D. Evaluación de la Respuesta, Seguridad y Farmacocinética en sujetos que han fracasado en el tratamiento anterior con BTKi y Venetoclax

En un punto temporal de análisis diferente, se evaluaron la respuesta, la seguridad y la farmacocinética en un grupo de nueve sujetos, entre los 23 sujetos totales, que han fracasado en el tratamiento anterior tanto con un inhibidor de la tirosina cinasa de Bruton (BTKi) como con venetoclax. La **Tabla E15** muestra las características de referencia de los 23 sujetos, evaluados en el Ejemplo 3.A-3.C anterior, y las de los sujetos que han fracasado con BTKi y venetoclax.

Tabla E15. Características basales		
	Todos los pacientes (N = 23)	Fracaso con BTKi y Venetoclax (n = 9)
Edad, años, mediana (intervalo)	66 (49-79)	68 (59-76)
Hombre, n (%)	11 (48)	4 (44)
Enfermedad voluminosa > 5 cm, n (%) ^a	8 (35)	4 (44)
Puntuación de riesgo BALL ¹ , mediana (intervalo)	2 (0-3)	2 (0-3)
SPD, mediana de cm ² (intervalo)	24,7 (2-197)	45,9 (2-197)
LDH, mediana de U/l (intervalo)	243 (119-634)	245 (119-634)
Terapia puente recibida, n (%)	17 (74)	7 (78)
Estadio, n (%)		
Estadio Rai III/IV	15 (65)	7 (78)
Estadio C de Binet	16 (70)	7 (78)
Características de riesgo alto (cualquiera), n (%)		
Del(17p)	8 (35)	2 (22)
Mutación TP53	14 (61)	6 (67)
Cariotipo complejo ^b	11 (48)	3 (33)
Líneas de terapia anterior, mediana (intervalo)		
ibrutinib anterior, n (%)	23 (100)	9 (100)
ibrutinib refractario/recidivante, n (%)	21 (91)	9 (100)

^aEnfermedad voluminosa definida como ≥ 1 lesión con un diámetro más largo de > 5 cm. ^b ≥ 3 aberraciones cromosómicas. ^cFracaso con venetoclax definido como interrupción debido a PD o < PR después de ≥ 3 meses de terapia.

LDH, lactato deshidrogenasa; SPD, suma del producto de diámetros perpendiculares.

¹. Soumerai JD *et al. Lancet Haematol.* 2019;6(7):e366-e374.

La **Tabla E16** muestra los acontecimientos adversos emergentes del tratamiento (TEAE) de los 23 sujetos en total o los nueve sujetos que fracasaron tanto con BTKi como con venetoclax. Se observaron toxicidades limitantes de la dosis (DLT) en dos sujetos que recibieron ND2 de las células modificadas por ingeniería genética: un sujeto presentó hipertensión de grado 4, y un sujeto, que estaba en el grupo de fracaso con BTKi y venetoclax, presentó encefalopatía de grado 3, debilidad muscular de grado 3 y síndrome de lisis tumoral de grado 4.

Tabla E16. Perfil de seguridad		
	Todos los pacientes (N = 23)	Fracaso con BTKi y Venetoclax (n = 9)
TEAE graves de cualquier grado, n (%)	13 (56,5)	5 (55,6)
CRS	6 (26)	2 (22)
Pirexia	4 (17)	2 (22)
Encefalopatía	3 (13)	1 (11)
Neutropenia febril	3 (13)	1 (11)
Neumonía	3 (13)	0
Lesión renal aguda	2 (9)	0
Afasia	2 (9)	1 (11)
Infección pulmonar	2 (9)	2 (22)
TLS	2 (9)	1 (11)

La **Tabla E17** muestra los acontecimientos adversos emergentes del tratamiento (TEAE) de interés especial de los 23 sujetos en total o los nueve sujetos que fracasaron tanto con BTKi como con venetoclax.

Tabla E17. TEAE de interés especial		
	Todos los pacientes ^a (N = 23)	Fracaso con BTKi y Venetoclax (n = 9)
CRS-cualquier grado, n (%)	17 (74)	6 (67)
Mediana del tiempo hasta el primer inicio, días (intervalo)	4 (1-10)	1,5 (1-4)
Mediana de la duración del primer acontecimiento, días (intervalo)	12 (2-50)	21 (6-50)
Grado 3, n (%)	2 (9)	1 (11)
NE^b - cualquier grado, n (%)	9 (39)	4 (44)
Mediana del tiempo hasta el primer inicio, días (intervalo)	6,5 (2-103)	6,5 (2-21)
Mediana de la duración del primer acontecimiento, días (intervalo)	21 (6-312)	23,5 (6-49)
Grado ≥ 3, ^c n (%)	5 (22)	3 (33)
Cualquier CRS o NE, ^b n (%)	18 (78)	7 (78)
Cualquier CRS y NE, ^b n (%)	8 (35)	3 (33)
Uso de tocilizumab y/o esteroides	17 (74)	6 (67)
TLS, n (%)	4 (17)	1 (11)
^a No hay diferencias en el perfil de TEAE entre los niveles de dosis. ^b Los NE son acontecimientos relacionados con el tratamiento definidos por el investigador. ^c los NE no son mutuamente excluyentes; encefalopatía (n = 3); afasia (n = 1); estado de confusión (n = 1); debilidad muscular (n = 1); somnolencia (n = 1).		

Las **FIG. 7A** y **7B** muestran la mejor respuesta global (**FIG. 7A**) y enfermedad residual mínima indetectable (uMRD) en sangre mediante citometría de flujo o en médula ósea mediante secuenciación de última generación (NGS) (**FIG. 7B**). La mediana de seguimiento del estudio fue de 11 meses. Como se muestra, se observó una alta proporción de respuestas duraderas, incluyendo CR, con una mejor ORR alta del 81,5 % en todos los sujetos evaluables y del 89 % en sujetos que han fracasado con BTKi y venetoclax.

La **FIG. 8** muestra la evaluación de la respuesta individual de los sujetos tratados que fracasaron tanto con BTKi como con venetoclax y los otros sujetos evaluables. Los resultados mostraron que la mayoría de los sujetos consiguieron una respuesta objetiva temprana el Día 30 (68 %; n = 15/22) y uMRD (75 %; n = 15/20), incluyendo 6 sujetos que fracasaron tanto con BTKi como con venetoclax (67 %). Los resultados mostraron que las respuestas se han profundizado con el tiempo en el 27 % (n = 6/22) de los sujetos en general y en el 33 % de los sujetos que fracasaron tanto con BTKi como con venetoclax (n = 3/9). Los resultados también mostraron que las respuestas duraderas se mantuvieron 6 meses después de la administración en la mayoría de los sujetos: el 87 % de todos los sujetos y (n = 13/15) el 83 % de los sujetos que fracasaron tanto con BTKi como con venetoclax (n = 5/6). El 83 % (n=5/6) de los sujetos con CR a los 6 meses permanecen en CR a los 9 meses, con 3 sujetos en CR pasados 12 meses. Dos sujetos que fracasaron tanto con BTKi como con venetoclax mantuvieron las respuestas más allá de los 12 meses.

La mediana de concentración de células CAR+ CD3+ de los sujetos a lo largo del tiempo después de la administración se muestra en la **FIG. 9**. Los resultados mostraron que el subconjunto de sujetos que fracasaron tanto con BTKi como con venetoclax tenían un perfil de PK/PD similar al de la población de sujetos completa.

E. Conclusión

La administración de células que expresan CAR anti-CD 19 a sujetos muy pretratados con CLL/SLL de riesgo alto, todos los cuales habían fracasado antes con ibrutinib, con más de la mitad también habiendo fracasado en el tratamiento anterior con venetoclax, dio como resultado una toxicidad manejable y una buena respuesta clínica. Los acontecimientos adversos fueron manejables, incluso en el subconjunto de sujetos que habían fracasado tanto con un BTKi como con venetoclax. Se observó que la CRS de grado 3 (9 %) y las NE de grado 3 o 4 (22 %) eran bajas. En una mediana de seguimiento de 11 meses, la administración de células que expresaban CAR anti-CD 19 dio como resultado una proporción alta de respuestas duraderas, incluyendo CR, incluso en sujetos que han fracasado tanto con BTKi anterior como con venetoclax. Se observó que las respuestas clínicas eran rápidas, mejoraban con el tiempo, y eran profundas y duraderas. Por ejemplo, la mayoría de las respuestas iniciales se consiguieron el Día 30, y las respuestas se profundizaron con el tiempo en el 27 % de los sujetos evaluados y en el 33 % de los sujetos que habían fracasado tanto con BTKi anterior como con venetoclax. Las respuestas objetivas duraderas se mantuvieron 6 meses después de la administración (87 % de los sujetos evaluados, 83 % de los sujetos que habían fracasado tanto con BTKi anterior como con venetoclax). El 83 % de los sujetos con CR a los 6 meses permanecieron en CR a los 9 meses, con 3 sujetos en CR pasados 12 meses. Los sujetos que fracasaron tanto con BTKi como con venetoclax anteriores presentaron un perfil de PK/PD similar al de la población de sujetos completa. Los resultados respaldan la administración de las células CAR+ anti-CD19 para sujetos con CLL/SLL, incluyendo aquellos con CLL/SLL de riesgo alto y aquellos que han fracasado con múltiples terapias anteriores, tal como una terapia anterior con BTKi y venetoclax.

La presente invención no pretende limitarse en su alcance a las realizaciones particulares desveladas, que se proporcionan, por ejemplo, para ilustrar diversos aspectos de la invención. Se harán evidentes diversas modificaciones de las composiciones y métodos que se describen a partir de la descripción y las enseñanzas del presente documento.

SECUENCIAS

SEQ ID NO.	SECUENCIA	DESCRIPCIÓN
1	ESKYGPPCPPCP	espaciador (bisagra de IgG4) (aa) Homo sapiens
2	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCTTGCCCT	espaciador (bisagra de IgG4) (nt) homo sapiens
3	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHY TQKSLSLSLGK	Bisagra-CH3 espaciador Homo sapiens
4	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVQLHQLNGLSKKCKVSNK GLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHN HYTQKSLSLSLGK	Bisagra-CH2-CH3 espaciador Homo sapiens
5	RWPESPKAQASSVPTAQPAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEKKKEKEKEEQE ERETKTPECPSTHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEV AGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSHSLTLPRSLWNAGTSTCTLNHPSLPPQR LMALREPAQAQPVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPNNILLMWLEDQRE VNTSGFAPARPPPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNA SRSLEVSIVTDH	IgD-bisagra-Fc Homo sapiens
6	LEGGEGRGSLTTCGDVEENPGPR	T2A artificial
7	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSI SGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDIKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHA FENLEIIRGRTKQHGFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNCYAN TINWKKLFGTSGQTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCR NVSRGREGVDKCNLLEGEPRFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQ CAHYIDGPHCVKTCFAGVMGENTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEG CPTNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM	tEGFR artificial
8	FWVLVWGGVLACYS LLVTVAFI FWV	CD28 (aminoácidos 153-179 del N.º de Acceso P 10747) Homo sapiens
9	IEWMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWVLVWGGVLACYS LLVTVAFI FWV	CD28 (aminoácidos 114-179 del N.º de Acceso P 10747) Homo sapiens
10	RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	CD28 (aminoácidos 180-220 de P 10747) Homo sapiens

11	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28 (LL a GG) Homo sapiens
12	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL	4-1BB (aminoácidos 214-255 de Q07011.1) Homo sapiens
13	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYS EIGMKGERRRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA LPPR	CD3 zeta Homo sapiens
14	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYS EIGMKGERRRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA LPPR	CD3 zeta Homo sapiens
15	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYS EIGMKGERRRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA LPPR	CD3 zeta Homo sapiens
16	RKVCNGIGIGIEFKDLSINATNIKHFKNCTSI S GDLHILPVAFRGDSFTHTPFL DPQELDLKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGGQFSLAVV SLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRG ENSCKATGQVCHALCSPEGCGWGPEDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPRF VENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGEN NTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCP TNGPKIPSIATGMVGALLLL LVVALGIGLFM	tEGFR artificial
17	EGRGSLLTCGDVEENPGP	T2A artificial
18	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
19	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
20	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
21	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A
22	PGGG- (SGGGG) 5-P- en donde P es prolina, G es glicina y S es serina	enlazador
23	GSADDAKKDAAKKDGKS	Enlazador
24	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	Enlazador
25	gacatccagatgaccagaccacctccagcctgagcgcagcctggggcagccgg gtgaccatcagctgccggggccagccaggaacatcagcaagtaacctgaactggat cagcagaagcccgacggcaccgtcaagctgctgatctaccacaccagccggctg cacagcggcgtgccagccgggttagcggcagcggctccggcaccgactacagc ctgaccatctccaaacctggaacaggaagatatcgccacctacttttgcagcag ggcaacacactgccctacacctttggcggcggaacaaagctggaaatcacccggc agcacctccggcagcggcaagcctggcagcggcgagggcagcaccgaagggcgag gtgaagctgcaggaagcggccctggcctggcggcccccagccagagcctgagc gtgacctgcacccgtgagcggcgtgagcctgcccactacggcgtgagctggatc cggcagcccccaggaagggcctggaatggcctggcggcgtgatctggggcagcag accacctactacaacagcgcctgaagagccggctgaccatcatcaaggacaac agcaagagccaggtgttccctgaagatgaacagcctgcagacccagcacacccg atctactactgcccagcactactactacggcggcagctaagccatggactac tggggccagggcaccagcgtgacccgtgagcagc	Secuencia que codifica scFv
26	X ₁ PPX ₂ P	Bisagra
	X ₁ es glicina, cisteína o arginina	
	X ₂ es cisteína o treonina	
27	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro	Bisagra
28	Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro	Bisagra
29	ELKTPLGDTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTP PPCPRCP	Bisagra
30	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro	Bisagra
31	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Bisagra
32	Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Bisagra
33	Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Bisagra
34	Glu Val Val Val Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Bisagra
35	RASQDISKYLN	CDR L1
36	SRLHSGV	CDR L2

37	GNTLPYTFG	CDR L3
38	DYGVVS	CDR H1
39	VIWGSETTYNSALKS	CDR H2
40	YAMDYWG	CDR H3
41	EVKLQESGPGLVAPSSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGS ETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMD YWGQGTSTVTVSS	VH
42	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRL HSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEIT	VL
43	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRL HSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITG STSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWI RQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTA IYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSS	scFv
44	KASQNVGTNVA	CDR L1
45	SATYRNS	CDR L2
46	QQYNRYPYT	CDR L3
47	SYWMN	CDR H1
48	QIYPGDGDTNYNGKFKG	CDR H2
49	KTISSVVDIFYDY	CDR H3
50	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNVKQRPQGQLEWIGQIYPG DGDNTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVVDIFY FDYWGQGTSTVTVSS	VH
51	DIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYR NSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKR	VL
52	GGGGSGGGSGGGGS	Enlazador
53	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNVKQRPQGQLEWIGQIYPG DGDNTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVVDIFY FDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKA SQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQ SKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKR	scFv
54	HYYYGGSYAMDY	CDR H3
55	HTSRLHS	CDR L2
56	QQGNTLPYT	CDR L3
57	ACACGGCCTCGTGTATTACTGT	Cebador de IGH
58	ACCTGAGGAGACGGTGACC	Cebador de IGH

REIVINDICACIONES

1. Una primera composición que comprende uno de entre linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T CD8⁺ para su uso con una segunda composición que comprende el otro de entre linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T CD8⁺ en un método de tratamiento de un sujeto que tiene leucemia linfocítica crónica (CLL) o linfoma linfocítico de células pequeñas (SLL), en donde el método comprende administrar al sujeto una dosis de linfocitos T modificados por ingeniería genética que comprenden linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ que comprenden un receptor de antígeno quimérico (CAR) que se une específicamente a CD19, en donde:
 - (i) el sujeto ha recaído después de la remisión después del tratamiento con, se vuelve refractario a o fracasó en el tratamiento con y/o es intolerante a ibrutinib y venetoclax;
 - (ii) la administración comprende administrar una pluralidad de composiciones separadas, en donde la pluralidad de composiciones separadas comprende la primera composición que comprende uno de entre linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T CD8⁺ y la segunda composición que comprende el otro de entre linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T CD8⁺;
 - y
 - (iii) la dosis de linfocitos T modificados por ingeniería genética comprende una relación definida de células CD4⁺ que expresan CAR con respecto a células CD8⁺ que expresan CAR, opcionalmente en donde la relación es de entre aproximadamente 1:3 y aproximadamente 3:1.
2. Una pluralidad de composiciones separadas que comprenden una primera composición que comprende uno de entre linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T CD8⁺ y una segunda composición que comprende el otro de entre linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T CD8⁺ para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que tiene leucemia linfocítica crónica (CLL) o linfoma linfocítico de células pequeñas (SLL), en donde el método comprende administrar al sujeto una dosis de linfocitos T modificados por ingeniería genética que comprenden linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ que comprenden un receptor de antígeno quimérico (CAR) que se une específicamente a CD 19, en donde:
 - (i) el sujeto ha recaído después de la remisión después del tratamiento con, se vuelve refractario a o fracasó en el tratamiento con y/o es intolerante a ibrutinib y venetoclax;
 - (ii) la administración comprende administrar la pluralidad de composiciones separadas, en donde la pluralidad de composiciones separadas comprende la primera composición que comprende uno de entre linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T CD8⁺ y la segunda composición que comprende el otro de entre linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T CD8⁺;
 - y
 - (iii) la dosis de linfocitos T modificados por ingeniería genética comprende una relación definida de células CD4⁺ que expresan CAR con respecto a células CD8⁺ que expresan CAR, opcionalmente en donde la relación es de entre aproximadamente 1:3 y aproximadamente 3:1.
3. La primera composición para el uso de la reivindicación 1 o la pluralidad de composiciones separadas para el uso de la reivindicación 2, en donde:
 - (i) la dosis de linfocitos T modificados por ingeniería genética está enriquecida para linfocitos T humanos primarios CD4⁺ y CD8⁺;
 - (ii) la relación definida de células CD4⁺ que expresan el CAR a células CD8⁺ que expresan el CAR es o es aproximadamente 1:1; y/o
 - (iii) la dosis de linfocitos T modificados por ingeniería genética comprende:
 - (a) exactamente o aproximadamente $2,5 \times 10^7$ células que expresan CAR totales a exactamente o aproximadamente $1,5 \times 10^8$ células que expresan CAR totales;
 - (b) exactamente o aproximadamente $2,5 \times 10^7$ células que expresan CAR totales a exactamente o aproximadamente $1,0 \times 10^8$ células que expresan CAR totales; y/o
 - (c) exactamente o aproximadamente $2,5 \times 10^7$ células que expresan CAR totales, exactamente o aproximadamente 5×10^7 células totales o células que expresan CAR totales, o exactamente o aproximadamente 1×10^8 células totales o células que expresan CAR totales.
4. La primera composición para el uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 3 o la pluralidad de composiciones separadas para el uso de la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en donde el CAR comprendido por los linfocitos T CD4⁺ y/o el CAR comprendido por los linfocitos T CD8⁺ comprenden un CAR que es el mismo y/o en donde los linfocitos T CD4⁺ y/o los linfocitos T CD8⁺ se modifican genéticamente para expresar un CAR que es el mismo.
5. La primera composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 y 4 o la pluralidad de composiciones separadas para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en donde:
 - (i) la primera composición comprende los linfocitos T CD8⁺ y la segunda composición comprende los linfocitos T CD4⁺, opcionalmente en donde el inicio de la administración de la primera composición se realiza antes del inicio de la administración de la segunda composición;
 - (ii) la administración de la primera composición y la administración de la segunda composición se realizan con no más de 48 horas de diferencia;
 - (iii) la administración de la primera composición y la administración de la segunda composición se realizan con no

más de 36 horas de diferencia, no más de 24 horas de diferencia, no más de 12 horas de diferencia, no más de 6 horas de diferencia, no más de 4 horas de diferencia, no más de 2 horas de diferencia, no más de 1 hora de diferencia o no más de 30 minutos de diferencia;

(iv) la administración de la primera composición y la administración de la segunda composición se realizan el mismo día, se realizan con entre aproximadamente 0 y aproximadamente 12 horas de diferencia, entre aproximadamente 0 y aproximadamente 6 horas de diferencia o entre aproximadamente 0 y aproximadamente 2 horas de diferencia;

o el inicio de la administración de la primera composición y el inicio de la administración de la segunda composición se realizan con entre aproximadamente 1 minuto y aproximadamente 1 hora de diferencia o entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 30 minutos de diferencia; y/o

(v) la primera composición y la segunda composición se administran con no más de 2 horas, no más de 1 hora, no más de 30 minutos, no más de 15 minutos, no más de 10 minutos o no más de 5 minutos de diferencia.

6. La primera composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-5 o la pluralidad de composiciones separadas para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-5, en donde:

(i) el sujeto tiene CLL o se sospecha que tiene CLL o el sujeto se identifica o se selecciona como que tiene CLL, opcionalmente en donde la CLL es una CLL recidivante o refractaria; y/o

(ii) el sujeto tiene SLL o se sospecha que tiene SLL o el sujeto se identifica o se selecciona como que tiene SLL, opcionalmente en donde el SLL es un SLL recidivante o refractario.

7. La primera composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-6 o la pluralidad de composiciones separadas para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en donde:

(i) antes de la administración de la dosis de linfocitos T modificados por ingeniería genética, el sujeto ha sido tratado con una o más terapias anteriores para CLL o SLL, distinta de otra dosis de células que expresan CAR o una terapia de agotamiento linfóide, opcionalmente en donde la una o más terapias anteriores comprenden al menos dos terapias anteriores, opcionalmente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más terapias anteriores;

(ii) exactamente o inmediatamente antes del momento de la administración de la dosis de linfocitos T modificados por ingeniería genética, el sujeto ha recaído después de la remisión después del tratamiento con, o se volvió refractario a, fracasó en y/o fue intolerante al tratamiento con una o más terapias anteriores para CLL o SLL;

(iii) exactamente o inmediatamente antes del momento de la administración de la dosis de linfocitos T modificados por ingeniería genética, el sujeto ha recaído después de la remisión después del tratamiento con, o se volvió refractario a, fracasó en y/o fue intolerante al tratamiento con dos o más terapias anteriores; y/o

(iv) exactamente o inmediatamente antes del momento de la administración de la dosis de linfocitos T modificados por ingeniería genética, el sujeto ha recaído después de la remisión después del tratamiento con, o se volvió refractario a, fracasó en y/o fue intolerante al tratamiento con tres o más terapias anteriores.

8. La primera composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-7 o la pluralidad de composiciones separadas para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-7, en donde en el momento o antes de la administración de la dosis de células:

(i) el sujeto tiene o se ha identificado que tiene una o más anomalías citogenéticas, opcionalmente asociadas a CLL o SLL de riesgo alto, opcionalmente seleccionadas de entre: cariotipo complejo o anomalías citogenéticas, del 17p, gen de IGVH sin mutación y mutación de TP53; y/o

el sujeto es o se ha identificado como que tiene CLL o SLL de riesgo alto;

(ii) el sujeto tiene o se ha identificado que tiene una o más anomalías citogenéticas, opcionalmente asociadas a CLL de riesgo alto, opcionalmente seleccionadas de entre: cariotipo complejo o anomalías citogenéticas, del 17p, gen de IGVH sin mutación y mutación de TP53; y/o

el sujeto tiene o se ha identificado que tiene CLL de riesgo alto, opcionalmente en donde el sujeto ha recaído después de la remisión después del tratamiento con, o se volvió refractario a, fracasó en y/o fue intolerante al tratamiento con dos o más terapias anteriores;

(iii) el sujeto es o se ha identificado como que tiene una CLL o un SLL de riesgo normal, opcionalmente en donde el sujeto ha recaído después de la remisión después del tratamiento con, o se volvió refractario a, fracasó en y/o fue intolerante al tratamiento con tres o más terapias anteriores; y/o

(iv) el sujeto es o se ha identificado como intolerante a un inhibidor de la tirosina cinasa de Bruton (BTK) y ha recibido un inhibidor de BTK durante una duración de menos de exactamente o aproximadamente 6 meses, y/o no es elegible para el tratamiento con un inhibidor de BTK, opcionalmente en donde:

(a) el sujeto es o se ha identificado como que tiene CLL o SLL de riesgo alto, y exactamente o inmediatamente antes del momento de la administración de la dosis de células, el sujeto ha recaído después de la remisión después del tratamiento con, o se volvió refractario a, fracasó en y/o fue intolerante al tratamiento con una o más terapias distintas del inhibidor de BTK; o

(b) el sujeto es o se ha identificado como que tiene una CLL o un SLL de riesgo normal, y exactamente o inmediatamente antes del momento de la administración de la dosis de células, el sujeto ha recaído después de la remisión después del tratamiento con, o se volvió refractario a, fracasó en y/o fue intolerante al tratamiento con dos o más terapias anteriores distintas del inhibidor de BTK.

9. La primera composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-8 o la pluralidad de composiciones separadas para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-8, en donde:

- (i) el sujeto tiene o se ha identificado como que tiene un estado ECOG de 0 o 1; y/o el sujeto no tiene un estado ECOG de >1;
- (ii) en el momento o inmediatamente antes de la administración de la dosis de células modificadas por ingeniería genética, el sujeto no tiene una transformación de Richter de CLL o SLL; y/o
- (iii) el sujeto es un adulto y/o tiene más de 50, 60 o 70 años de edad o aproximadamente.

10. La primera composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-9 o la pluralidad de composiciones separadas para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-9, en donde:

- (i) los linfocitos T modificados por ingeniería genética son linfocitos T primarios obtenidos de un sujeto;
- (ii) los linfocitos T modificados por ingeniería genética son autólogos al sujeto; y/o
- (iii) la dosis de células modificadas son células viables.

11. La primera composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-10 o la pluralidad de composiciones separadas para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-10, en donde:

- (i) el método comprende además, antes de la administración de la dosis de linfocitos T modificados por ingeniería genética, administrar una terapia de agotamiento linfoide al sujeto y/o en donde el sujeto se ha preacondicionado con una terapia de agotamiento linfoide, opcionalmente en donde:
 - (a) la terapia de agotamiento linfoide comprende la administración de fludarabina y/o ciclofosfamida;
 - (b) la terapia de agotamiento linfoide comprende la administración de ciclofosfamida a aproximadamente 200-400 mg/m², opcionalmente a exactamente o aproximadamente 300 mg/m², inclusive, y/o fludarabina a aproximadamente 20-40 mg/m², opcionalmente 30 mg/m², diariamente durante 2-4 días, opcionalmente durante 3 días; y/o
 - (c) la terapia de agotamiento linfoide comprende la administración de ciclofosfamida a exactamente o aproximadamente 300 mg/m² y fludarabina a aproximadamente 30 mg/m² diariamente durante 3 días, opcionalmente en donde la dosis de células se administra al menos exactamente o aproximadamente 2-7 días después de la terapia de agotamiento linfoide o al menos exactamente o aproximadamente 2-7 días después del inicio de la terapia de agotamiento linfoide; y/o
- (ii) la administración de la dosis de linfocitos T modificados por ingeniería genética y/o la terapia de agotamiento linfoide se realiza a través de suministro ambulatorio.

12. La primera composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-11 o la pluralidad de composiciones separadas para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-11, en donde, de una pluralidad de sujetos tratados de acuerdo con el método:

- (i) la respuesta en al menos el 50 %, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80 %, al menos el 90 % de los sujetos tratados es una tasa de respuesta objetiva; y/o la respuesta en al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 % o al menos el 70 % de los sujetos tratados está en remisión completa (CR), opcionalmente en donde la duración de la respuesta hasta la progresión es duradera durante más de 3 meses o más de 6 meses;
- (ii) más del 50 %, más del 60 % o más del 70 % tenían una enfermedad residual mínima (MRD) indetectable durante al menos un mes, al menos dos meses, al menos tres meses o al menos 6 meses después de administrar la dosis de linfocitos T modificados por ingeniería genética;
- (iii) no más del 10 % de los sujetos presentan un síndrome de liberación de citocinas (CRS) superior al grado 2; y/o
- (iv) no más del 10 %, no más del 20%, no más del 30 % o no más del 40 % de los sujetos presentan una neurotoxicidad superior al grado 2,

opcionalmente en donde la pluralidad de sujetos tratados de acuerdo con el método comprende una pluralidad de sujetos que han recaído después de la remisión después del tratamiento con, se vuelven refractarios a, fracasaron en el tratamiento con y/o son intolerantes a ibrutinib y venetoclax.

13. La primera composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-12 o la pluralidad de composiciones separadas para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-12, en donde:

- el CAR comprende un dominio de unión a antígeno extracelular específico para CD 19, un dominio transmembrana, un dominio de señalización citoplasmático derivado de una molécula coestimuladora, que opcionalmente es un BB 4-1, y un dominio de señalización citoplasmático derivado de una molécula que contiene ITAM de señalización primaria, que opcionalmente es un CD3zeta;
- el CAR comprende, en orden, un dominio de unión a antígeno extracelular específico para CD19, un dominio transmembrana, un dominio de señalización citoplasmático derivado de una molécula coestimuladora y un dominio

de señalización citoplasmático derivado de una molécula que contiene ITAM de señalización primaria.

14. La primera composición para el uso de la reivindicación 13 o la pluralidad de composiciones separadas para el uso de la reivindicación 13, en donde el dominio de unión a antígeno es un scFv, opcionalmente en donde:

el scFv comprende una secuencia de CDRL1 de RASQDISKYLN (SEQ ID NO: 35), una secuencia de CDRL2 de SRLHSGV (SEQ ID NO: 36) y/o una secuencia de CDRL3 de GNTLPYTFG (SEQ ID NO: 37) y/o una secuencia de CDRH1 de DYGVSV (SEQ ID NO: 38), una secuencia de CDRH2 de VIWGSETTYNSALKS (SEQ ID NO: 39) y/o una secuencia de CDRH3 de YAMDYWG (SEQ ID NO: 40);

el scFv comprende una región de cadena pesada variable de FMC63 y una región de cadena ligera variable de FMC63 y/o una secuencia de CDRL1 de FMC63, una secuencia de CDRL2 de FMC63, una secuencia de CDRL3 de FMC63, una secuencia de CDRH1 de FMC63, una secuencia de CDRH2 de FMC63 y una secuencia de CDRH3 de FMC63 o se une al mismo epítipo o compite por la unión a cualquiera de los anteriores;

el scFv comprende un VH expuesto en la SEQ ID NO: 41 y un VL expuesto en la SEQ ID NO: 42, opcionalmente en donde el VH y el VL están separados por un enlazador flexible, opcionalmente en donde el enlazador flexible es o comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 24; y/o

el scFv es o comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 43.

15. La primera composición para el uso de la reivindicación 13 o 14 o la pluralidad de composiciones separadas para el uso de la reivindicación 13 o la reivindicación 14, en donde:

(i) la región de señalización coestimuladora es un dominio de señalización de CD28 o 4-1BB;

(ii) la región de señalización coestimuladora es un dominio de señalización de 4-1BB;

(iii) el dominio coestimulador comprende la SEQ ID NO: 12 o una variante de la misma que tiene 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 mismas;

(iv) el dominio de señalización primario es un dominio de señalización CD3zeta;

(v) el dominio de señalización primario comprende la SEQ ID NO: 13 o 14 o 15 que tiene 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 mismas; y/o

(vi) el CAR comprende además un espaciador entre el dominio transmembrana y el scFv, opcionalmente en donde: (a) el espaciador es un espaciador polipeptídico que comprende o consiste en toda o una porción de una bisagra de inmunoglobulina o una versión modificada de la misma, opcionalmente, una bisagra de IgG4 o una versión modificada de la misma;

(b) el espaciador tiene aproximadamente 15 aminoácidos o menos, y no comprende una región extracelular de CD28 o una región extracelular de CD8; y/o

(c) el espaciador tiene exactamente o aproximadamente 12 aminoácidos de longitud.

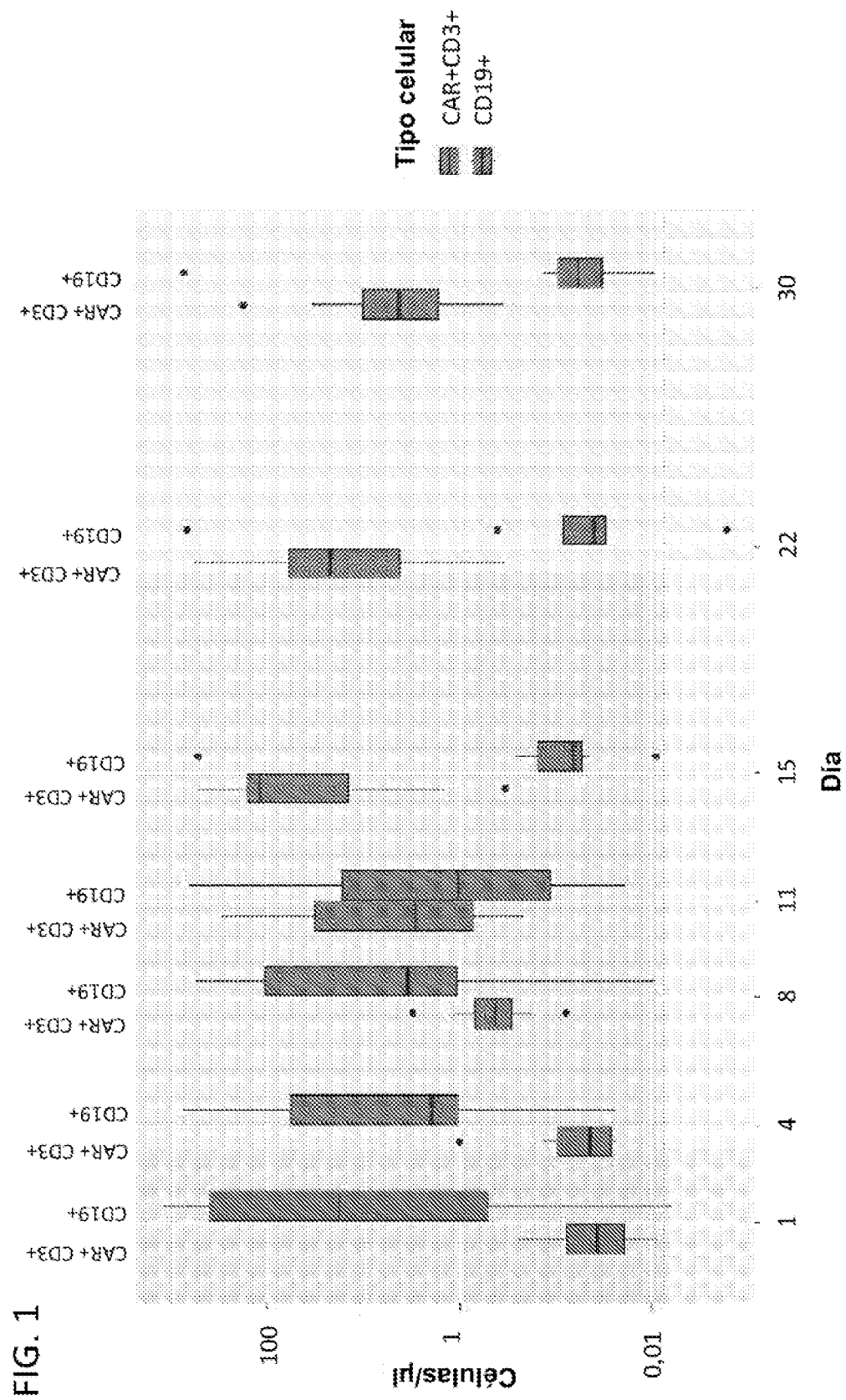


FIG. 2

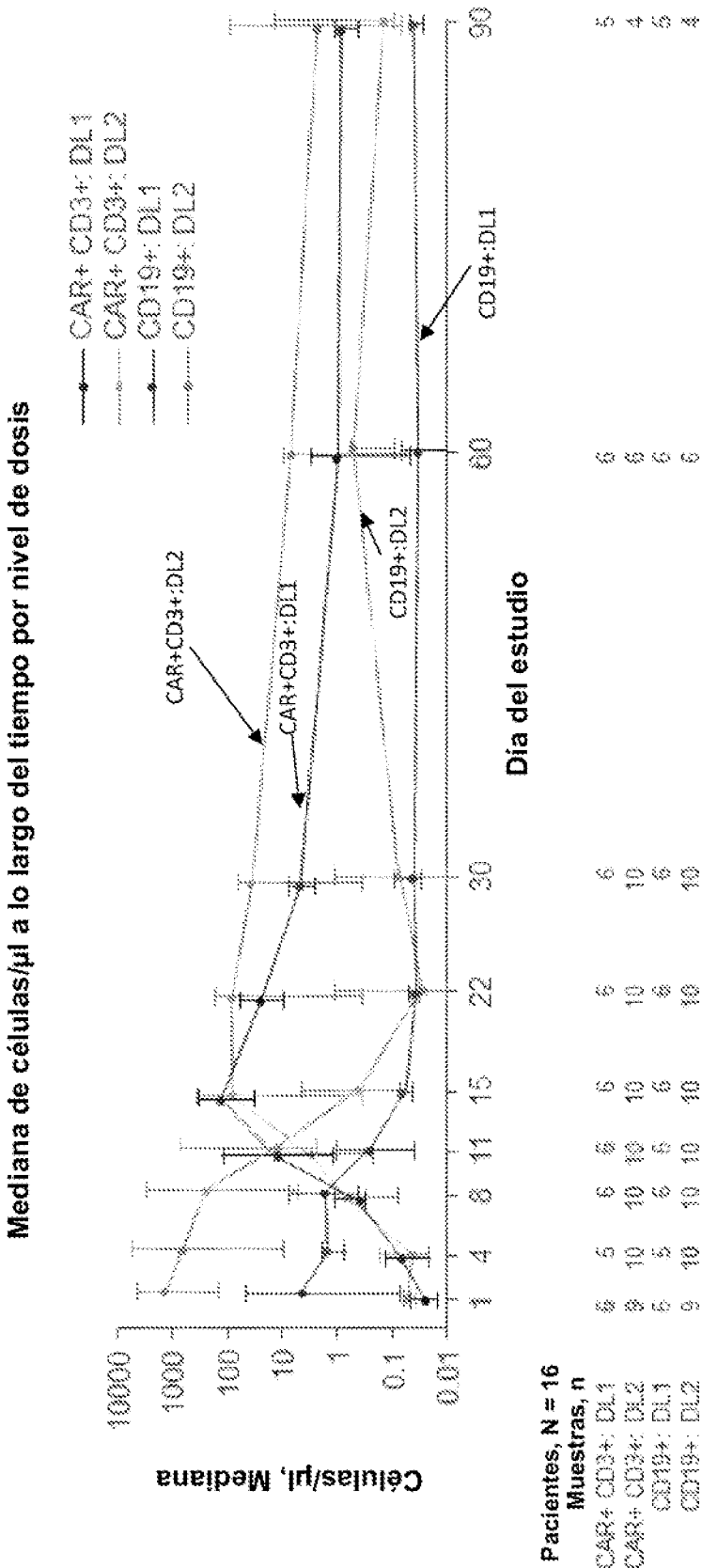


FIG. 3A

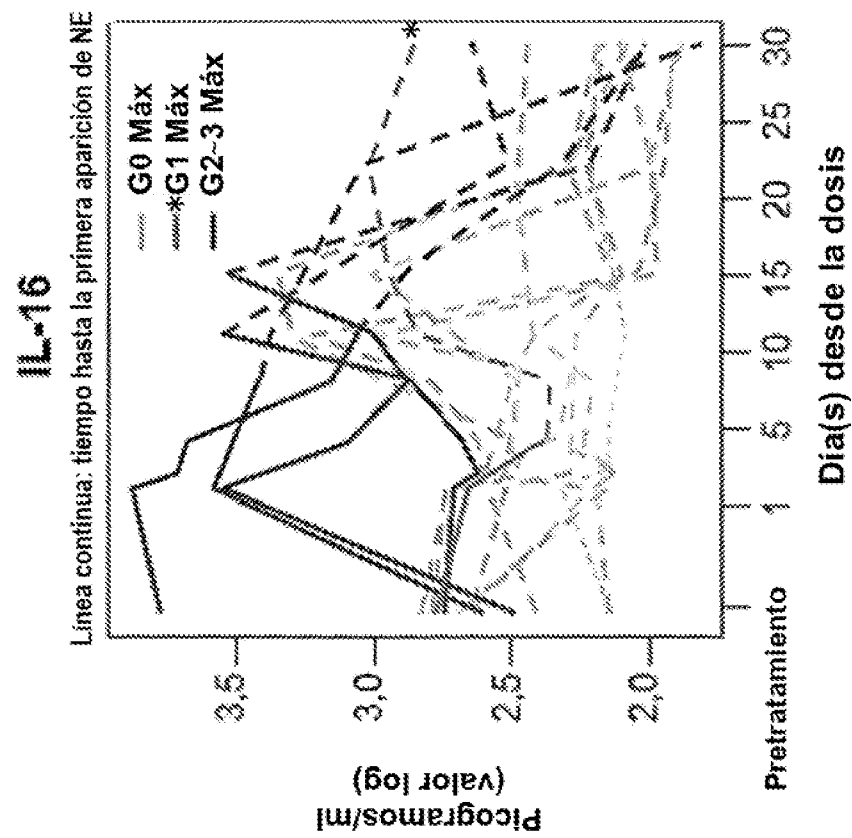


FIG. 3B

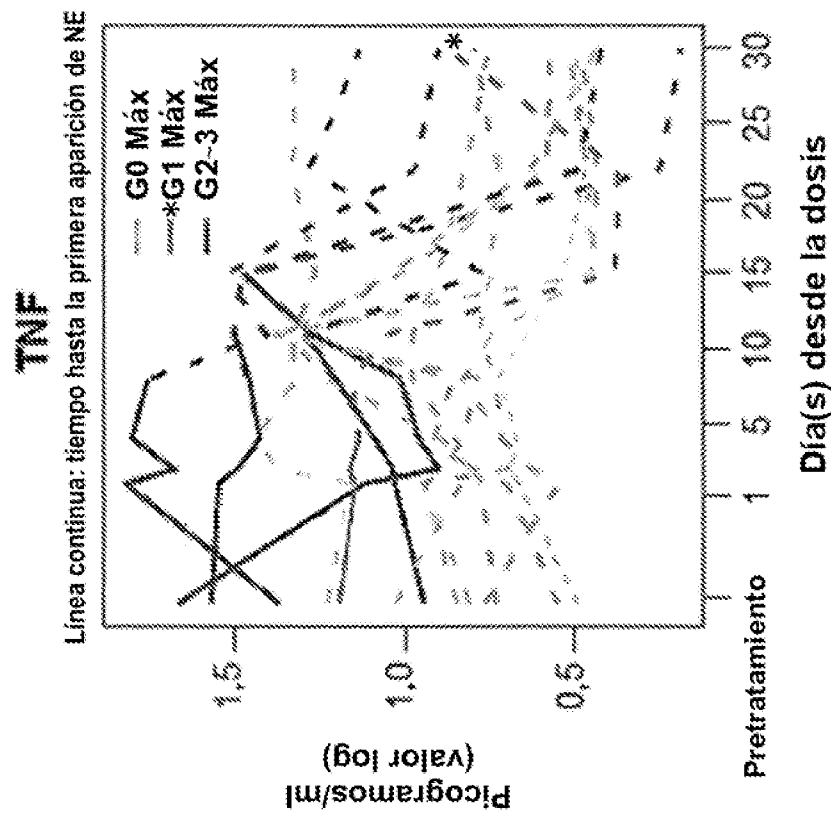


FIG. 4B

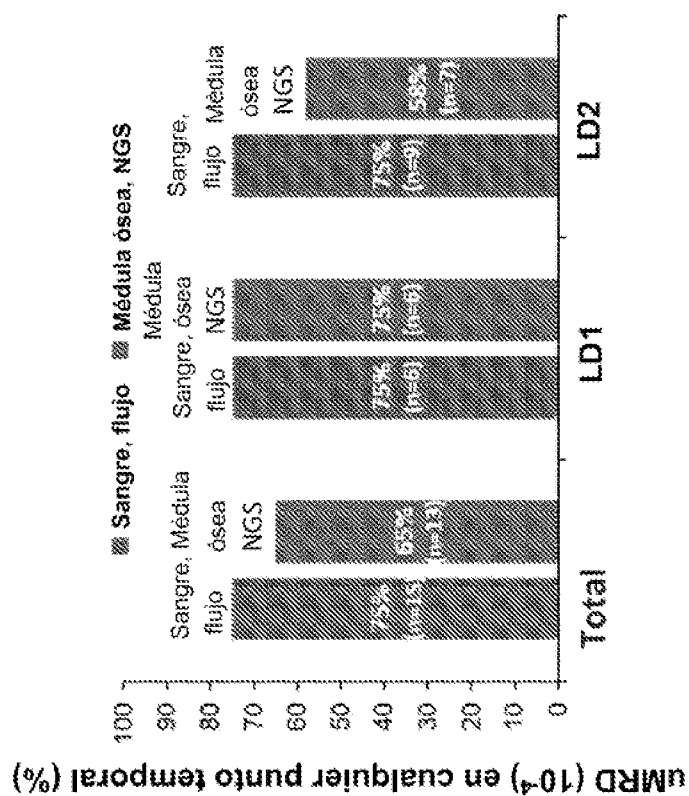
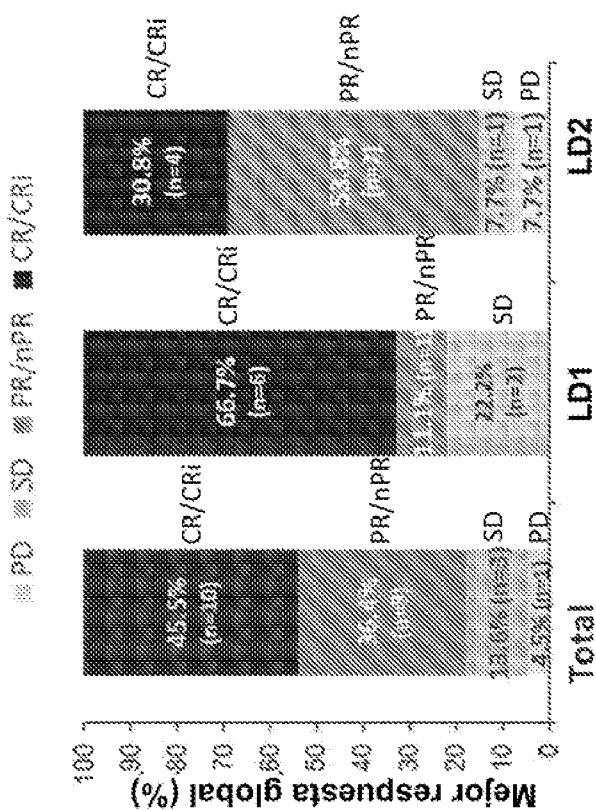


FIG. 4A



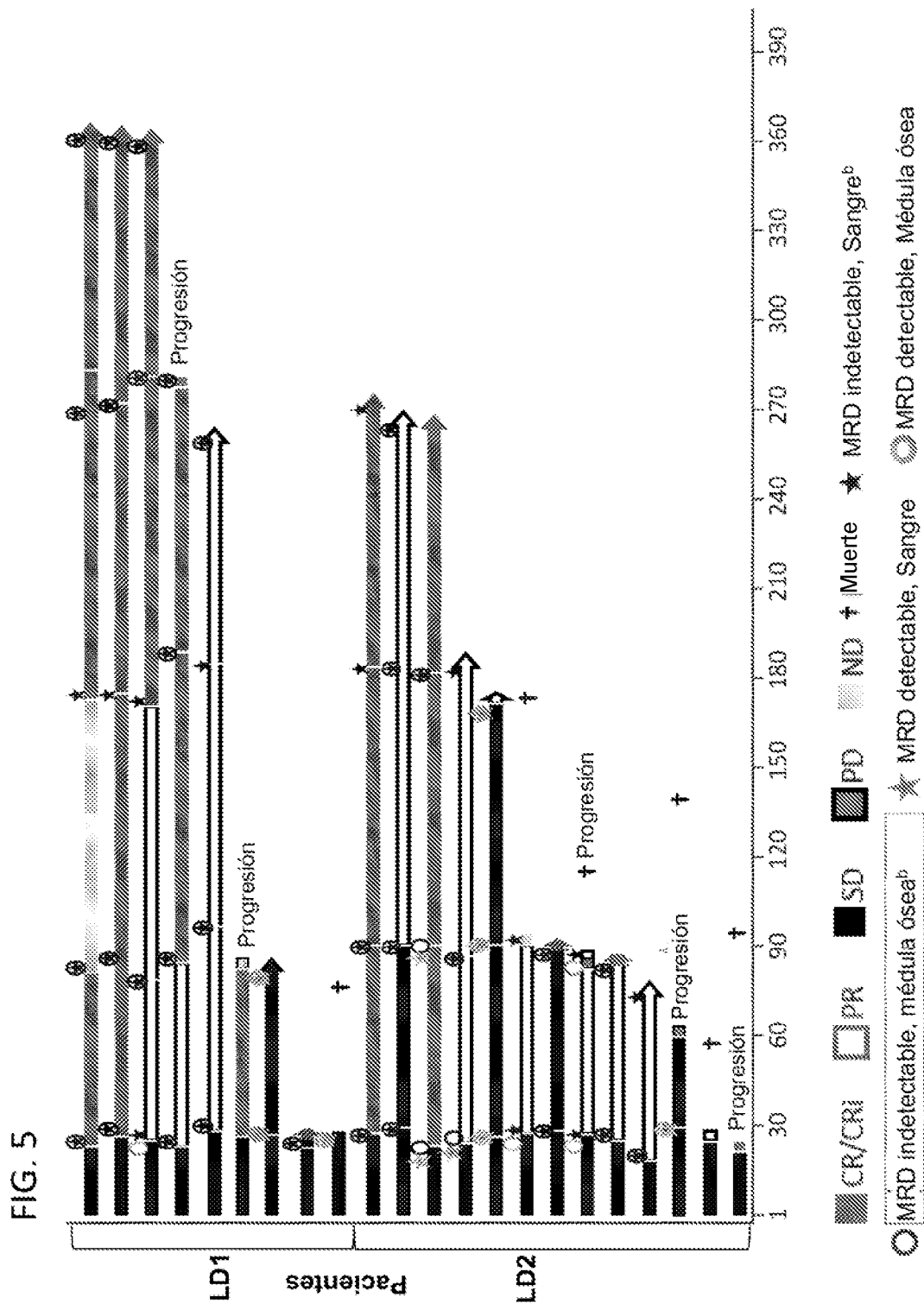


FIG. 6

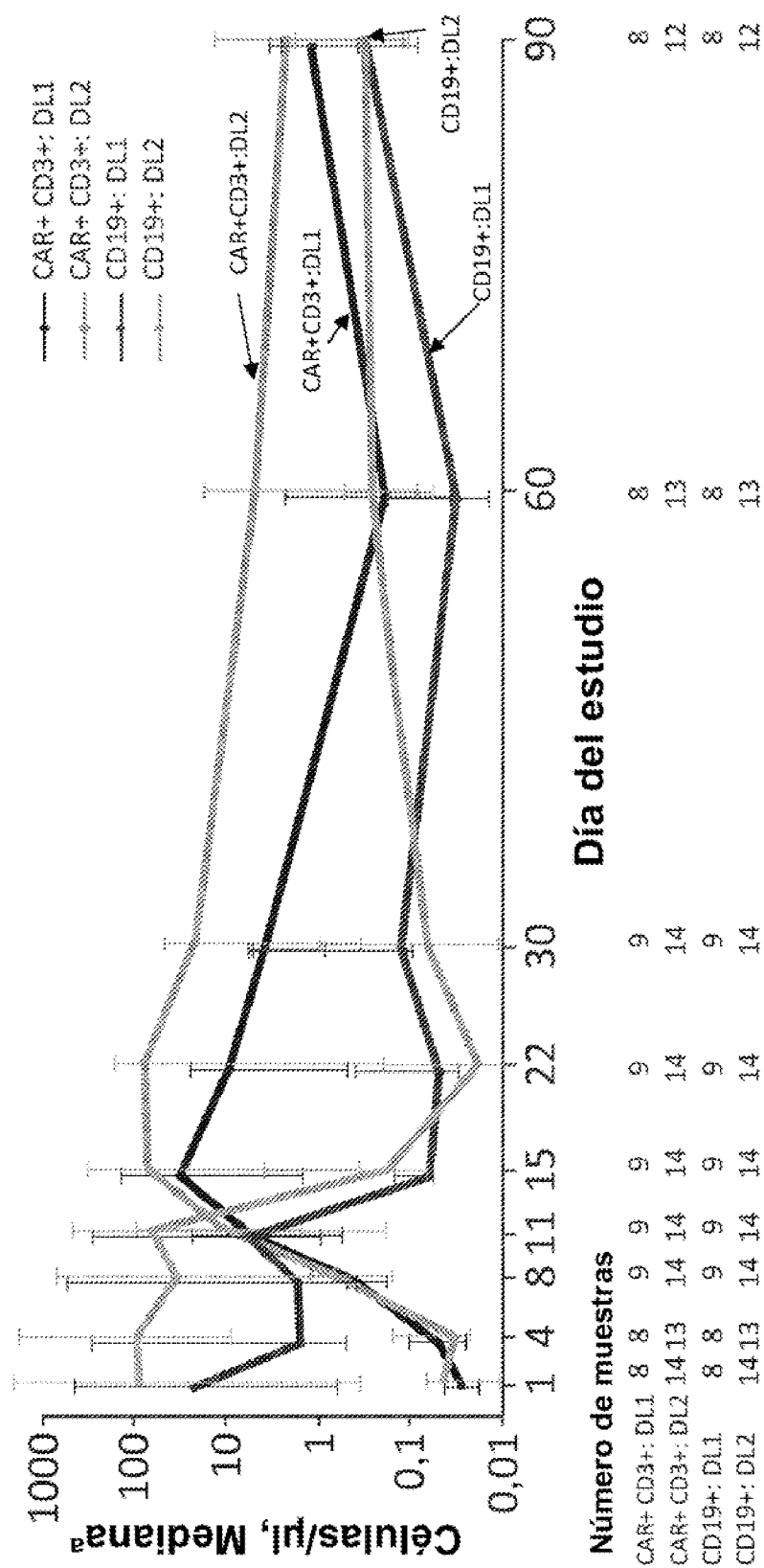


FIG. 7A

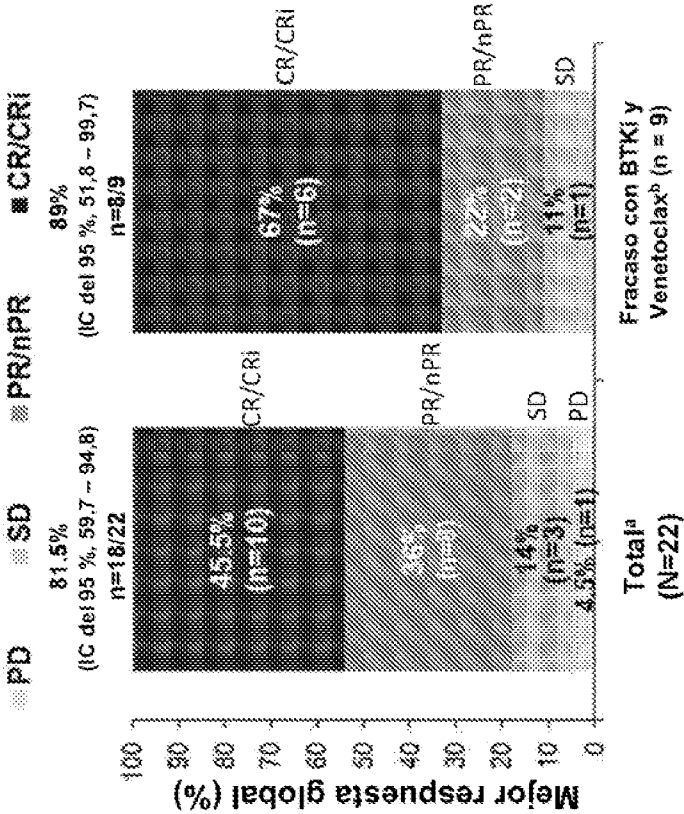


FIG. 7B

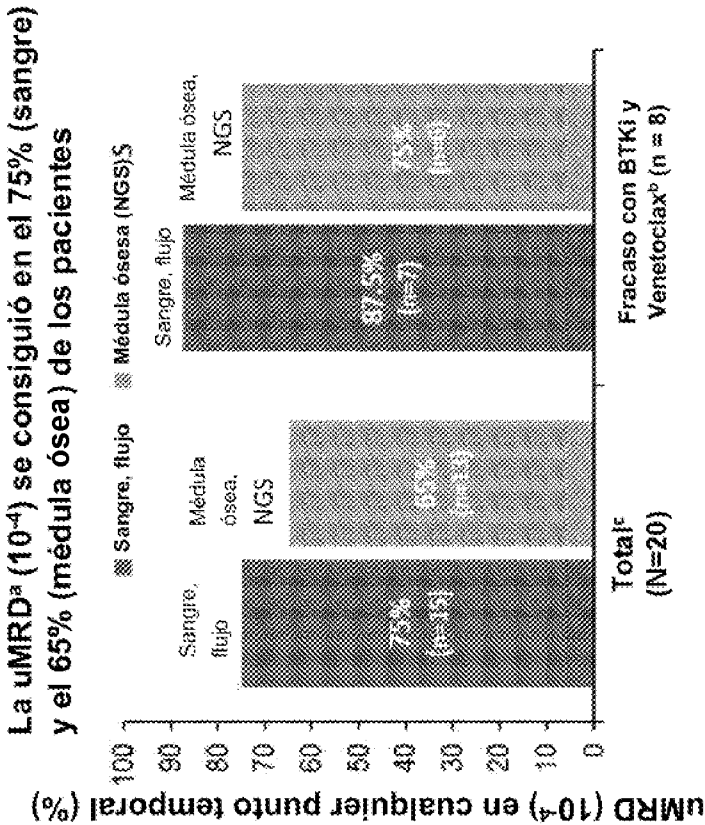


FIG. 8

