

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 992 909**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**C12N 5/0783** (2010.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.08.2018** **PCT/US2018/046151**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.02.2019** **WO19032929**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.08.2018** **E 18760160 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2024** **EP 3664835**

54 Título: **Métodos y composiciones para preparar células genomodificadas**

30 Prioridad:

**09.08.2017 US 201762543359 P**

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

**19.12.2024**

73 Titular/es:

**JUNO THERAPEUTICS, INC. (100.0%)**  
**400 Dexter Avenue North, Suite 1200**  
**Seattle, WA 98109, US**

72 Inventor/es:

**BONYHADI, MARK L.**

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 2 992 909 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 y composiciones para preparar células genomodificadas

## 5 Referencia a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica prioridad con respecto de la solicitud provisional de los EE. UU. N.º 62/543.359, presentada el 9 de agosto de 2017, titulada "MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA PREPARAR CÉLULAS GENOMODIFICADAS".

## 10 Campo

La presente divulgación se refiere a métodos para preparar linfocitos T para terapia celular, a composiciones producidas por los métodos y a métodos de administración de las células a los sujetos. En particular, la divulgación se refiere a la preparación de linfocitos T genomodificados, tales como los que expresan los receptores genomodificados, tales como los receptores de antígenos genomodificados, tales como los TCR genomodificados (recombinantes) y los receptores quiméricos para el antígeno (CAR, *chimeric antigen receptors*), u otros receptores quiméricos recombinantes. Las características de los métodos incluyen la producción de un producto de linfocitos T más consistente y/o predecible y/o de menor toxicidad en comparación con otros métodos. Los métodos proporcionados incluyen la incubación de células en condiciones estimulantes para inducir la ampliación o proliferación de linfocitos T de tipo indiferenciado (*naïve-like*) en comparación con los linfocitos T de tipo no indiferenciado (*non-naïve like*) en la composición estimulada, lo que a su vez puede dar lugar a una transducción preferencial de células procedentes de linfocitos T de tipo indiferenciado. Las características de los métodos también pueden incluir la reducción de costes, del número de etapas y del gasto en recursos en comparación con otros métodos.

## 25 Antecedentes

Existen diferentes métodos para preparar células para su uso terapéutico y administrarlas. Por ejemplo, existen métodos para preparar células, incluyendo linfocitos T, para genomodificación y terapia celular, incluidos los métodos que implican el empobrecimiento o el enriquecimiento de determinadas subpoblaciones. Es necesario mejorar los métodos, por ejemplo, reducir la toxicidad asociada a determinadas administraciones de terapia celular adoptiva, mejorar el proceso de fabricación, permitir mejorar la administración y/o reducir costes u otros recursos. Se proporcionan métodos que satisfacen dichas necesidades.

Gardner *et al.* (2017) Blood 129(25):3322-3331 describen la remisión de la leucemia con intención de tratamiento mediante linfocitos T CAR CD19 de formulación y dosis definidas en niños y adultos jóvenes. En el documento WO2015/164675 se describen métodos para aislar, cultivar y genomodificar poblaciones de células inmunitarias para la terapia adoptiva. Xu *et al.* (2016) Oncotarget 7:82354-82368 describen que el análisis comparativo multiparamétrico revela impactos diferenciales de diversas citocinas sobre el fenotipo y la función de los linfocitos T CAR *ex vivo* e *in vivo*. Mock *et al.* (2016) Cytotherapy 18(8):1002-1011 describen la fabricación automatizada de linfocitos T receptores quiméricos para el antígeno para inmunoterapia adoptiva utilizando CliniMACS Prodigy. En el documento WO2012/129514 se describen métodos y composiciones para la inmunoterapia celular. Levine *et al.* (2016) Molecular Therapy 4:91-1001 describen la fabricación global de la terapia de linfocitos T CAR.

## 45 Sumario

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

En el presente documento se proporcionan métodos para estimular linfocitos T que incluyen (a) incubar, en condiciones estimulantes, una composición de entrada que contenga linfocitos T, con una cantidad iniciadora de cultivo de linfocitos T de tipo indiferenciado o de un subconjunto de linfocitos T CD8+ de los mismos, produciendo de este modo una composición estimulada; y (b) introducir en la composición celular estimulada un ácido nucleico que codifique un receptor recombinante genomodificado, en donde el método genera de este modo una composición de salida que contiene linfocitos T que expresan el receptor recombinante genomodificado. En particular, la invención proporciona un método para estimular linfocitos T y generar una composición que comprenda linfocitos T que expresen un receptor recombinante genomodificado, comprendiendo el método:

(a) incubar, en condiciones estimulantes, una composición de entrada que comprenda linfocitos T que comprenda una cantidad iniciadora de cultivo de linfocitos T de tipo indiferenciado o de un subconjunto de linfocitos T CD8+ de los mismos, produciendo de este modo una composición estimulada, en donde:

(i) las condiciones estimulantes comprenden la presencia de un reactivo estimulador que comprende un agente primario que es un anticuerpo anti-CD3 y un agente secundario que es un anticuerpo anti-CD28, en donde el reactivo estimulador activa uno o más dominios de señalización intracelular de uno o más componentes de un complejo TCR y/o uno o más dominios de señalización intracelular de una o más moléculas coestimuladoras, generando de este modo una composición estimulada, y en donde el tiempo de estimulación es de entre 2 y 6

días; y

(ii) la cantidad iniciadora de cultivo de linfocitos T de tipo indiferenciado o de un subconjunto de linfocitos T CD8+ de los mismos es o es de al menos  $2 \times 10^8$  de los linfocitos T de tipo indiferenciado o de un subconjunto de linfocitos T CD8+ de los mismos, en donde los linfocitos T de tipo indiferenciado o los linfocitos T CD8+ de tipo indiferenciado son CD27+ y CCR7+; y

(b) introducir en la composición celular estimulada un ácido nucleico que codifique un receptor recombinante genomodificado, en donde el método genera de este modo una composición de salida que comprende linfocitos T que expresan el receptor recombinante genomodificado, en donde la introducción se realiza durante al menos una parte de la incubación o se realiza después de la incubación.

En algunas realizaciones, los linfocitos T contienen linfocitos T de tipo indiferenciado y linfocitos T de tipo no indiferenciado, en donde las condiciones estimulantes inducen preferentemente la ampliación o proliferación de los linfocitos T de tipo indiferenciado en comparación con los linfocitos T de tipo no indiferenciado de la composición estimulada. En la invención, la introducción se realiza durante al menos una parte de la incubación o se realiza después de la incubación.

En algunas realizaciones, la cantidad iniciadora de cultivo de linfocitos T de tipo indiferenciado o de un subconjunto de linfocitos T CD8+ de los mismos, es de, o de aproximadamente,  $2 \times 10^8$  a  $5 \times 10^8$ , de, o de aproximadamente,  $2 \times 10^8$  a  $4 \times 10^8$  de los linfocitos T de tipo indiferenciado o de un subconjunto de linfocitos T CD8+ de los mismos. En algunos casos, la cantidad iniciadora de cultivo de linfocitos T de tipo indiferenciado o de un subconjunto de linfocitos T CD8+ de los mismos, es de al menos o de aproximadamente al menos o es o es de aproximadamente  $2 \times 10^8$  o  $4 \times 10^8$  de los linfocitos T de tipo indiferenciado o de un subconjunto de linfocitos T CD8+ de los mismos. En la invención, la cantidad iniciadora de cultivo de linfocitos T de tipo indiferenciado o de un subconjunto de linfocitos T CD8+ de los mismos, es de al menos o de aproximadamente al menos o es o es de aproximadamente de  $2 \times 10^8$  de los linfocitos T de tipo indiferenciado o de un subconjunto de linfocitos T CD8+ de los mismos.

En la invención, la cantidad iniciadora de cultivo de linfocitos T de tipo indiferenciado o de un subconjunto de linfocitos T CD8+ de los mismos, es de al menos o de aproximadamente al menos o es o es de aproximadamente  $2 \times 10^8$  de los linfocitos T de tipo indiferenciado o de un subconjunto de linfocitos T CD8+ de los mismos. En algunos aspectos, la cantidad iniciadora de cultivo es una cantidad de linfocitos T CD8+ de tipo indiferenciado.

En la invención, los linfocitos T de tipo indiferenciado o los linfocitos T CD8+ de tipo indiferenciado son CD27+ y CCR7+. En algunas de estas realizaciones, los linfocitos T de tipo indiferenciado o los linfocitos T CD8+ de tipo indiferenciado son positivos en la superficie para un marcador de activación de linfocitos T seleccionado del grupo que consiste en CD45RA, CD27, CD28 y CCR7; y/o son negativos en la superficie para un marcador seleccionado del grupo que consiste en CD25, CD45RO, CD56, CD62L, KLRG1; y/o tienen baja expresión de CD95; y/o son negativos para la expresión intracelular de una citocina seleccionada del grupo que consiste en IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10. En algunas realizaciones, los linfocitos de tipo indiferenciado o los linfocitos CD8+ de tipo indiferenciado son positivos en la superficie para un marcador de activación de linfocitos T seleccionado del grupo que consiste en CD45RA, CD27, CD28 y CCR7; y/o son negativos en la superficie para un marcador seleccionado del grupo que consiste en CD45RO, CD56, KLRG1; y/o tienen baja expresión de CD95. En algunas realizaciones, los linfocitos T de tipo indiferenciado o los linfocitos CD8+ de tipo indiferenciado son CD45RA+, CD27+, CCR7+, CD62-, y/o CD45RO-.

En algunas de estas realizaciones, los linfocitos T de tipo no indiferenciado son negativos en la superficie para un marcador de activación de linfocitos T seleccionado del grupo que consiste en CD45RA, CD27, CD28 y CCR7; y/o son positivos en la superficie para un marcador seleccionado del grupo que consiste en CD25, CD45RO, CD56, CD62L, KLRG1 y perforina; y/o son positivos para la expresión intracelular positiva de una citocina seleccionada del grupo que consiste en IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10; y/o tienen alta expresión de CD95. En algunos aspectos, los linfocitos T de tipo no indiferenciado son CD45RA-, CD27-, CCR7-, CD62+, y/o CD45RO+.

En algunas realizaciones, antes de la incubación, las células de la composición de entrada no se han sometido, y no se someten, a una etapa de selección basada en un marcador endógeno de la superficie de linfocitos T que diferencia entre linfocitos T de tipo indiferenciado y linfocitos T de tipo no indiferenciado.

En la invención, el método incluye la introducción de un receptor recombinante genomodificado en las células estimuladas, en donde el método genera de este modo una composición de salida que incluye linfocitos T que expresan el receptor recombinante genomodificado. En la invención, la introducción se realiza durante al menos una parte de la incubación o se realiza después de la incubación. En algunos casos, la incubación de la composición en condiciones estimulantes se realiza antes, durante y/o después de la introducción de un ácido nucleico que codifica un receptor recombinante genomodificado.

En algunas realizaciones, el receptor recombinante es capaz de unirse a un antígeno diana que está asociado a, es específico para, y/o se expresa en, una célula o tejido de una enfermedad, trastorno o afección. En algunos ejemplos, la enfermedad, el trastorno o la afección es una enfermedad infecciosa o un trastorno infeccioso, una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria, o un tumor o un cáncer. En algunos casos, el antígeno diana es un

antígeno tumoral. En algunas realizaciones, el antígeno diana se selecciona entre integrina  $\alpha\beta 6$  (integrina  $\alpha v\beta 6$ ), antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA, *B cell maturation antigen*), anhidrasa carbónica 9 (CAIX), Her2/neu (tirosina cinasa receptora erbB2), L1-CAM, B7-H3, B7-H6, anhidrasa carbónica 9 (CA9, también conocida como CAIX o G250), un antígeno del cáncer de testículo, antígeno 1B de cáncer/testículo (CTAG, también conocido como NY-ESO-1 y LAGE-2), antígeno carcinoembrionario (CEA) y antígeno de superficie de la hepatitis B, receptor anti-folato, una ciclina, ciclina A2, ligando 1 de quimiocinas con motivo C-C (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, condroitín sulfato proteoglicano 4 (CSPG4), proteína del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), glucoproteína 2 epitelial (EPG-2), glucoproteína 40 epitelial (EPG-40), efrina B2, receptor de efrina A2 (EPHA2), erb-B2, erb-B3, erb-B4, dímeros erbB, mutación del receptor del factor de crecimiento epidérmico de tipo III (EGFR VIII), proteína de unión a folato (FBP), receptor Fc de tipo 5 (FCRL5; también conocido como receptor Fc homólogo 5 o FCRH5), receptor de acetilcolina fetal (AChR fetal), una proteína de unión a folato (FBP), receptor alfa de folato, gangliósido GD2, GD2 O-acetilado (OGD2), gangliósido GD3, glipicano-3 (GPC3), Receptor 5D acoplado a proteína G (GPRC5D), Her2/neu (tirosina cinasa receptora erbB2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), dímeros erbB, antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA) humano, antígeno de superficie de la hepatitis B, antígeno leucocitario humano A1 (HLA-A1), antígeno leucocitario humano A2 (HLA-A2), receptor IL-22 alfa (IL-22R-alfa), IL-13R-alfa2 (IL-13R $\alpha$ 2), receptor del dominio de inserción de cinasa (kdr), cadena ligera kappa, Lewis Y, molécula L1 de adhesión celular (L1-CAM), epítipo CE7 de L1-CAM, miembro A de la familia 8 que contiene repeticiones ricas en leucina (LRR8A), Lewis Y, antígeno asociado a melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, mesotelina (MSLN), c-Met, citomegalovirus (CMV) murino, mucina 1 (MUC1), MUC16, ligandos citolíticos naturales del miembro D de grupo 2 (NKG2D), melan A (MART-1), molécula de adhesión celular neural (NCAM), antígeno oncofetal, antígeno preferentemente expresado del melanoma (PRAME), receptor de progesterona, un antígeno específico de próstata, antígeno prostático de células madre (PSCA), antígeno prostático específico de membrana (PSMA), receptor 1 huérfano similar a tirosina cinasa receptora (ROR1), survivina, glucoproteína trofoblástica (TPBG también conocida como 5T4), glucoproteína 72 asociada a tumores (TAG72), proteína 1 relacionada con tirosinasa (TRP1, también conocida como TYRP1 o gp75), proteína 2 relacionada con tirosinasa (TRP2, también conocida como dopacromo tautomerasa, dopacromo delta-isomerasa o DCT), receptor alfa de folato, 8H9, antígeno dual, glucoproteína 100 (gp100), receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-R2), receptor de estrógenos, receptor de progesterona, Tumor de Wilms 1 (WT-1), un antígeno específico de patógeno o expresado por patógeno y un antígeno asociado a una etiqueta universal.

En algunas realizaciones, el receptor recombinante es o contiene un receptor funcional de antígeno que no es un TCR o un TCR o fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunas realizaciones, el receptor recombinante es un receptor quimérico para el antígeno (CAR).

En algunas de estas realizaciones, el receptor recombinante contiene un dominio extracelular que contiene un dominio de unión a antígeno, opcionalmente, en donde el dominio de unión a antígeno se une específicamente al antígeno diana. En algunos casos, el dominio de unión al antígeno es o contiene un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo, que opcionalmente es un fragmento monocatenario. En algunos aspectos, el fragmento contiene regiones variables de anticuerpo unidas por un enlazador flexible. En algunos casos, el fragmento contiene un scFv.

En algunas realizaciones, el receptor recombinante contiene además un espaciador y/o una región bisagra. En algunos aspectos, el receptor recombinante contiene una región de señalización intracelular. En algunos ejemplos, la región de señalización intracelular contiene un dominio de señalización intracelular. En algunos aspectos, el dominio de señalización intracelular es o contiene un dominio de señalización primario, un dominio de señalización que es capaz de inducir una señal de activación primaria en un linfocito T, un dominio de señalización de un componente del receptor de linfocitos T (TCR), y/o un dominio de señalización que contenga un motivo de activación inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM, *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*). En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular es o contiene un dominio de señalización intracelular de una cadena CD3, opcionalmente una cadena CD3-zeta (CD3 $\zeta$ ), o una porción de señalización de la misma.

En algunas realizaciones, el receptor recombinante contiene además un dominio transmembrana dispuesto entre el dominio extracelular y la región de señalización intracelular. En algunos aspectos, la región de señalización intracelular contiene además una región de señalización coestimuladora. En algunas realizaciones, la región de señalización coestimuladora contiene un dominio de señalización intracelular de una molécula coestimuladora de linfocitos T o una porción de señalización de la misma. En algunos casos, la región de señalización coestimuladora contiene un dominio de señalización intracelular de un CD28, un 4-1BB o un ICOS o una porción de señalización del mismo. En algunas realizaciones, el CAR comprende un scFv específico para el antígeno, un dominio transmembrana, un dominio de señalización citoplasmática procedente de una molécula coestimuladora, que opcionalmente es o comprende un dominio de señalización 4-1BB y un dominio de señalización citoplasmática procedente de una molécula de señalización primaria que contenga un ITAM, que opcionalmente es o comprende un dominio de señalización CD3zeta y opcionalmente comprende además un espaciador entre el dominio transmembrana y el scFv; el CAR comprende, en orden, un scFv específico para el antígeno, un dominio transmembrana, un dominio de señalización citoplasmática procedente de una molécula coestimuladora, que opcionalmente es o comprende un dominio de señalización 4-1BB y un dominio de señalización citoplasmática procedente de una molécula de señalización primaria que contenga un ITAM, que opcionalmente es un dominio de señalización CD3zeta; o el CAR comprende, en orden, un scFv específico

para el antígeno, un espaciador, un dominio transmembrana, un dominio de señalización citoplasmática procedente de una molécula coestimuladora, que opcionalmente es un dominio de señalización 4-1BB y un dominio de señalización citoplasmática procedente de una molécula de señalización primaria que contenga un ITAM, que opcionalmente es o comprende un dominio de señalización CD3zeta.

5 En algunas realizaciones, la región de señalización coestimuladora está entre el dominio transmembrana y la región de señalización intracelular.

10 En algunas de estas realizaciones, la condición estimulante incluye la incubación con un reactivo estimulador capaz de activar linfocitos T, linfocitos T CD4+ y/o linfocitos T CD8+; es capaz de inducir una señal a través de un complejo TCR; y/o es capaz de inducir la proliferación de linfocitos T, linfocitos T CD4+ y/o linfocitos T CD8+. En la invención, la condición estimulante incluye la incubación con un reactivo estimulador capaz de activar uno o más dominios de señalización intracelular de uno o más componentes de un complejo TCR y/o uno o más dominios de señalización intracelular de una o más moléculas coestimuladoras. En la invención, el reactivo estimulador contiene un agente primario que se une específicamente a un miembro de un complejo TCR que se une específicamente a CD3. En la invención, el agente primario es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno.

15 En la invención, el agente estimulador incluye además un agente secundario que se une específicamente a una molécula coestimuladora de linfocitos T en donde la molécula coestimuladora es CD28. En la invención, el agente primario es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno. En la invención, los agentes primarios y secundarios incluyen anticuerpos en donde uno o más agentes estimulantes incluyen la incubación con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28.

20 En algunas realizaciones, los agentes primarios y/o secundarios están presentes en la superficie de un soporte sólido. En algunos casos, el soporte sólido es, o contiene, una perla. En algunas realizaciones, la perla contiene un diámetro mayor o superior a aproximadamente 3,5 µm pero no superior a aproximadamente 9 µm o no superior a aproximadamente 8 µm o no superior a aproximadamente 7 µm o no superior a aproximadamente 6 µm o no superior a aproximadamente 5 µm. En algunos ejemplos, la perla contiene un diámetro de, o de aproximadamente, 4,5 µm. En algunos aspectos, la perla contiene un diámetro que es o es de aproximadamente el mismo tamaño que el de un linfocito o una célula presentadora de antígeno.

En algunas realizaciones, la perla es inerte. En algunos casos, la perla es o contiene una superficie de poliestireno, y opcionalmente contiene un núcleo magnético o superparamagnético.

35 En algunas realizaciones, la condición estimulante incluye incubar las células con una proporción entre perlas y células que es de, o de aproximadamente, 1:1 a 10:1, de, o de aproximadamente, 1:1 a 8:1, de, o de aproximadamente, 1:1 a 6:1, de, o de aproximadamente, 1:1 a 4:1, de, o de aproximadamente, 1:1 a 3:1, de, o de aproximadamente, 2:1 a 4:1, de, o de aproximadamente, 2:1 a 3:1, de, o de aproximadamente, 1:1 a 2:1, de, o de aproximadamente, 4:1 a 10:1, de, o de aproximadamente, 4:1 a 8:1, de, o de aproximadamente, 4:1 a 6:1, de, o de aproximadamente, 6:1 a 10:1, de, o de aproximadamente, 6:1 a 8:1, de, o de aproximadamente, 8:1 a 10:1, de, o de aproximadamente, 1:1 a 1:10, de, o de aproximadamente, 1:1 a 1:8, de, o de aproximadamente, 1:1 a 1:6, de, o de aproximadamente, 1:1 a 1:4, de, o de aproximadamente, 1:2 a 1:3. En algunos ejemplos, la proporción entre perlas y células es de, o de aproximadamente, 3:1. En algunas realizaciones, la proporción entre perlas y células es de, o de aproximadamente, 1:1.

45 En algunas de estas realizaciones, los linfocitos T proceden de una muestra biológica, opcionalmente, en donde la muestra biológica procede de un sujeto humano. En algunos casos, la muestra biológica es o contiene una muestra de sangre entera, una muestra de capa leucoplaquetaria, una muestra de células mononucleares de sangre periférica (CMSP), una muestra no fraccionada de linfocitos T, una muestra de linfocitos, una muestra de glóbulos blancos, un producto de aféresis o un producto de leucocitaféresis.

50 En algunas realizaciones, los linfocitos T contienen linfocitos CD4+ y/o CD8+. En algunas realizaciones, los linfocitos T incluyen linfocitos T CD4+ y CD8+ y la proporción entre linfocitos T CD4+ y CD8+ está entre o entre aproximadamente 2:1 y es de, o de aproximadamente, 1:5. En algunos casos, una proporción entre los linfocitos CD4+ y los linfocitos CD8+ es o es de aproximadamente 1:1, 1:2, 2:1, 1:3 o 3:1. En algunas realizaciones, los linfocitos T de tipo indiferenciado incluyen linfocitos T CD4+ de tipo indiferenciado y/o linfocitos T CD8+ de tipo indiferenciado.

55 En algunas de estas realizaciones, los linfocitos T de tipo indiferenciado son policlonales. En algunos casos, la clonalidad de los linfocitos T de tipo indiferenciado se determina mediante secuenciación clonal, opcionalmente, secuenciación de nueva generación, o análisis de espectratipos.

60 En algunas realizaciones, la presencia, cantidad, número o porcentaje de linfocitos T de tipo indiferenciado se detecta mediante citometría de flujo.

65 En algunas de estas realizaciones, la condición estimulante no incluye N-acetilcisteína (NAC). En algunas realizaciones, la condición estimulante no contiene IL-15 y/o IL-7. En algunas realizaciones, la condición estimulante

da como resultado o induce la muerte de los linfocitos T de tipo indiferenciado o de una subpoblación de los mismos. En algunos aspectos, la condición estimulante da como resultado la muerte celular inducida por activación (MCIA) de linfocitos T de tipo indiferenciado o de una subpoblación de los mismos.

- 5 En algunas realizaciones, el método incluye además la adición de ADNasa durante la incubación y/o en la composición estimulada.

- 10 En algunas realizaciones, la incubación se lleva a cabo durante más de o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 días. En algunas realizaciones, el porcentaje de células, en la composición estimulada, procedente de los linfocitos T de tipo indiferenciado se multiplica por más de, o más de aproximadamente, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 50 veces, 100 veces en comparación con el porcentaje de linfocitos indiferenciados en la composición de entrada. En algunas realizaciones, la relación, en la composición estimulada, de células procedentes de los linfocitos T de tipo indiferenciado en comparación con las células procedentes de los linfocitos T de tipo indiferenciado se multiplica por más de, o más de aproximadamente, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 50 veces, 100 veces en comparación con la proporción de los linfocitos T de tipo indiferenciado en comparación con linfocitos T de tipo no indiferenciado en la composición de entrada.

- 20 En algunos casos, la composición estimulada contiene más del 75 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de células que proceden de linfocitos T de tipo indiferenciado de la composición de entrada. En algunas realizaciones, la composición estimulada contiene menos del 10 % de células procedentes de los linfocitos T de tipo indiferenciado. En algunos ejemplos, la composición estimulada contiene menos del 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 % o 0,1 % de células procedentes de los linfocitos T no indiferenciados.

- 25 En algunas realizaciones, de la células de la composición de entrada, un mayor porcentaje de los linfocitos T de tipo indiferenciado, en comparación con los linfocitos T de tipo no indiferenciado, se inducen a proliferar y/o se activan. En algunos aspectos, un mayor porcentaje de los linfocitos T que eran de tipo indiferenciado en la composición de entrada, en comparación con el porcentaje de los linfocitos T que eran de tipo no indiferenciado en la composición de entrada, se divide los días 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 después de iniciar dicha incubación. En algunos casos, las condiciones estimulantes son capaces de inducir la proliferación de un mayor porcentaje de células de una población de linfocitos T de tipo indiferenciado humanos, en comparación con los linfocitos T de tipo no indiferenciado humanos, los días 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 después de iniciar la incubación en las condiciones.

- 35 En algunas de estas realizaciones, los linfocitos T de tipo no indiferenciado se seleccionan del grupo que consiste en linfocitos T efectores ( $T_{EF}$ ), linfocitos T de memoria, linfocitos T de memoria central ( $T_{MC}$ ), linfocitos T efectores de memoria ( $T_{EM}$ ), y combinaciones de los mismos; o los linfocitos T de tipo no indiferenciado son una pluralidad de linfocitos T que incluye o consiste en linfocitos T efectores ( $T_{EF}$ ) y/o linfocitos T de memoria, los linfocitos T de memoria contienen opcionalmente linfocitos T de memoria central ( $T_{MC}$ ) y/o linfocitos T efectores de memoria ( $T_{EM}$ ).

- 40 En algunas realizaciones, el porcentaje de linfocitos T de tipo indiferenciado en la composición de entrada es menor que el porcentaje de células genomodificadas en la composición estimulada procedentes de linfocitos T de tipo indiferenciado en la composición de entrada. En algunas realizaciones, un mayor porcentaje de las células introducidas con el ácido nucleico son, o proceden de, la proliferación de, linfocitos T de tipo indiferenciado en la composición de entrada, en comparación con los linfocitos T de tipo no indiferenciado en la composición de entrada.

- 45 En algunas de estas realizaciones, la introducción es por transducción. En algunas realizaciones, el ácido nucleico contiene un vector vírico. En algunos casos, el vector vírico es un vector retrovírico. En algunos aspectos, el vector vírico es un vector lentivírico o un vector gammaretrovírico. En algunas realizaciones, la introducción se realiza por transposición de un transposón que contiene la molécula de ácido nucleico. En algunas realizaciones, la proporción de linfocitos T de tipo indiferenciado en comparación con los linfocitos T de tipo no indiferenciado en la composición estimulada se multiplica por más de, o más de aproximadamente, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 50 veces, 100 veces en comparación con la proporción de los linfocitos T de tipo indiferenciado en comparación con linfocitos T de tipo no indiferenciado en la composición de entrada. En algunas realizaciones, la composición estimulada es más policlonal o multiclonal en comparación con la composición de entrada. En la invención, el método se realiza *in vitro* o *ex vivo*.

### Descripción detallada

- 60 Cualquier referencia en el presente documento a métodos para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia debe interpretarse como una referencia a productos (p. ej., composiciones o formulaciones) para su uso en dichos métodos.

Las realizaciones de la presente invención se incluyen en algunos de los casos y aspectos desvelados a continuación.

- 65 En el presente documento se desvelan métodos para incubar (p. ej., estimular) células en el proceso de preparación de células para terapia celular adoptiva, y composiciones y células producidas por los métodos. En algunas

realizaciones, las células incluyen linfocitos T, que en algunos aspectos expresan receptores de antígenos genomodificados. En algunos casos, los receptores de antígenos genomodificados incluyen receptores de linfocitos T (TCR, *T cell receptors*) genomodificados o recombinantes y receptores funcionales de antígenos que no son TCR, tales como receptores quiméricos para el antígeno (CAR, *chimeric antigen receptors*).

En algunos casos, se desvelan métodos para incubar (p. ej., estimular) linfocitos T. Los métodos disponibles han utilizado anti-CD3 y anti CD28 para la estimulación de linfocitos T. Sin embargo, los métodos actualmente disponibles no se han centrado en obtener poblaciones diana específicas de células mediante el proceso de incubación y en producir una población más deseable de linfocitos T y en los resultados beneficiosos de la misma. Los métodos disponibles tampoco dan lugar a la eliminación de una población de linfocitos T no deseable y específica de una población de linfocitos T de entrada en el proceso de incubación ni a los resultados beneficiosos de la misma. Por otra parte, los métodos disponibles no están diseñados para eliminar, de una población de linfocitos T, durante el proceso de incubación, una subpoblación que se utilizará para generar una composición de salida que comprenda linfocitos T que expresen un receptor recombinante genomodificado. Los métodos disponibles tampoco describen beneficios que incluyan la producción de una población más consistente y/o predecible de linfocitos T que sea beneficiosa para la genomodificación, posología y/o respuesta clínica.

En algunos aspectos, los casos desvelados desvelan métodos para generar un mayor número de linfocitos T de composición más uniforme y/o predecible en comparación con otros métodos de estimulación y, en algunos aspectos, proporcionan además la disminución o eliminación de poblaciones no deseables de linfocitos T, p. ej., células cuya presencia pueda conferir al producto final una heterogeneidad tal que resulte difícil predecir su concentración, eficacia y seguridad. En algunos casos, los métodos desvelados abordan problemas relacionados con la generación de linfocitos T genomodificados en los que un gran número o la mayor parte de dichos linfocitos genomodificados proceden de linfocitos T de tipo no indiferenciado. En algunos aspectos, la falta de persistencia, el agotamiento y/o los problemas relacionados con la toxicidad pueden asociarse a terapia adoptiva con linfocitos T que implica una composición que contiene linfocitos genomodificados procedentes de linfocitos T de tipo no indiferenciado y/o en la que el porcentaje o el número de linfocitos genomodificados procedentes de linfocitos T de tipo no indiferenciado, es superior a un determinado umbral. En algunos casos, los métodos que dan lugar a una composición de linfocitos T genomodificados que está enriquecida en células procedentes de células de tipo indiferenciado, pueden presentar características relacionadas con un aumento general del porcentaje de células sanas y/o de células en la composición que presentan una mayor persistencia en comparación con otros métodos en los que dichas células de tipo indiferenciado no están tan enriquecidas.

Por consiguiente, entre los métodos para preparar linfocitos T genomodificados para terapia adoptiva desvelados en el presente documento, se encuentran los que utilizan condiciones que dan lugar a una ampliación o proliferación o genomodificación preferente de células procedentes de linfocitos T de tipo indiferenciado (o procedentes de linfocitos T CD27+, CD45RA+, CCR7+, CD62L- o CD45RO-) en comparación con las procedentes de linfocitos T de tipo no indiferenciado (o procedentes de linfocitos T CD27-, CD45RA-, CCR7-, CD62L+ o CD45RO+). En algunos casos, los métodos consisten en incubar linfocitos T en una composición de entrada que contiene linfocitos T de tipo indiferenciado en condiciones estimulantes que producen preferentemente una composición estimulada que contiene células procedentes de linfocitos T de tipo indiferenciado de la composición de entrada. En algunos aspectos, la población de linfocitos T contiene una mezcla de linfocitos T de tipo indiferenciado y de linfocitos T de tipo no indiferenciado. En algunos casos, las condiciones estimulantes inducen preferentemente una respuesta en los linfocitos T de tipo no indiferenciado en comparación con los linfocitos T de tipo indiferenciado. En algunos casos, la respuesta incluye la activación preferente de los linfocitos T de tipo no indiferenciado, que, en algunos casos, puede provocar la muerte celular.

En algunos casos, el método incluye la incubación de células en condiciones estimulantes, incluida la incubación con un agente estimulador capaz de activar uno o más dominios de señalización intracelular de uno o más componentes de un complejo TCR y/o uno o más dominios de señalización intracelular de una o más moléculas coestimuladoras. En algunos casos, el agente primario se une específicamente a CD3 y/o la molécula coestimuladora se selecciona del grupo que consiste en CD28, CD137(4-1-BB), OX40 o ICOS. Por ejemplo, en algunos casos, el agente primario es o comprende anti-CD3 y el agente secundario es o comprende anti-CD28. En algunos casos, los agentes primarios y secundarios comprenden anticuerpos y/o están presentes en la superficie de un soporte sólido. En algunos ejemplos, el soporte sólido es una perla.

En algunos casos, la condición estimulante incluye la incubación de las células de la composición de entrada con dicho reactivo estimulador, p. ej., perlas anti-CD3/anti-CD28, en la que la proporción entre perlas y células es de, o de aproximadamente, 1:1 a 10:1, de, o de aproximadamente, 1:1 a 8:1, de, o de aproximadamente, 1:1 a 6:1, de, o de aproximadamente, 1:1 a 4:1, de, o de aproximadamente, 1:1 a 3:1, de, o de aproximadamente 4:1 a 10:1, de, o de aproximadamente, 4:1 a 8:1, de, o de aproximadamente, 4:1 a 6:1, de, o de aproximadamente 6:1 a 10:1, de, o de aproximadamente, 6:1 a 8:1, de, o de aproximadamente, 8:1 a 10:1, de, o de aproximadamente, 1:1 a 1:10, de, o de aproximadamente, 1:1 a 1:8, de, o de aproximadamente, 1:1 a 1:6, de, o de aproximadamente, 1:1 a 1:4, de, o de aproximadamente, 1:2 a 1:3. En algunos ejemplos específicos, la proporción entre perlas y células es de, o de aproximadamente, 3: 1. En algunos casos, la proporción entre perlas y células es de, o de aproximadamente, 1:3.

Los métodos generalmente incluyen además etapas de genomodificación de la composición estimulada de linfocitos T. La genomodificación puede llevarse a cabo o iniciarse en la composición estimulada, a continuación o en cualquier momento después de iniciar la incubación inicial, y/o simultáneamente con la incubación. En algunos casos, las células se incuban con ácidos nucleicos que codifican dichas moléculas genomodificadas, de tal manera que se introducen ácidos nucleicos y las moléculas genomodificadas se expresan en las células de la composición, generando de este modo una composición de salida. Entre las moléculas genomodificadas se encuentran las proteínas, tales como receptores de antígenos genomodificados, incluidos los receptores quiméricos para el antígeno (CAR) y otros receptores recombinantes, tales como receptores quiméricos con porciones extracelulares de unión a ligando y porciones de señalización intracelular.

También se desvelan composiciones iniciadoras de cultivo, composiciones estimuladas y composiciones de salida, utilizadas o generadas por los métodos descritos. También se desvelan métodos que implican la administración de dichas composiciones y células a sujetos que lo necesitan, incluidos los pacientes con cáncer. También se desvelan kits que incluyen las composiciones y/o células producidas por cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

Los métodos pueden ser ventajosos y producir un producto más deseable. En algunos casos, los métodos desvelados permiten un proceso de fabricación más consistente. En algunos casos, los métodos desvelados producen células que dan lugar a una transducción y/o ampliación más uniforme en las etapas posteriores de la genomodificación de las células. En algunos casos, la transducción y/o ampliación más uniforme puede dar lugar a un producto de linfocitos T que sea más predecible a lo largo del proceso de fabricación. En algunos casos, el producto de linfocitos T puede dosificarse de forma más consistente para su administración a un sujeto. En algunos contextos, dichas características pueden reducir o impedir la posible toxicidad y/o los resultados y síntomas asociados en sujetos que siguen una terapia celular adoptiva.

Los títulos de sección utilizados en el presente documento tienen únicamente fines organizativos y no han de interpretarse como una limitación de la materia objeto descrita.

### Breve descripción de los dibujos

Las **FIGS. 1A-1D** representan resultados de composiciones de linfocitos T CAR<sup>+</sup> generadas a partir de procesos ampliados y no ampliados que implican un reactivo estimulador basado en perlas (*Bead*), un reactivo estimulador basado en perlas e incubación en medio basal (*Bead-Basal Media*, medio basal con perlas), o un reactivo estimulador oligomérico (*Oligomer*). La **FIG. 1A** representa el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> positivos tanto para CCR7 como para CD27. La **FIG. 1B** representa el porcentaje de linfocitos CCR7<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> para los linfocitos T CD4<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>. La **FIG. 1C** representa el porcentaje de linfocitos CCR7<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> para linfocitos T CD8<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>. La **FIG. 1D** muestra el porcentaje de linfocitos CCR7<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> generados a partir de un donante representativo de un proceso ampliado a varios días durante el proceso de fabricación, incluyendo la activación el día 1 (d1 AMAT), la transducción el día 2 (d2 XMAT), y a diferentes momentos después del inicio del cultivo (d4 INOC+2, d6 INOC+4, d7 INOC+5).

Las **FIGS. 2A-2D** muestran las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de los sujetos a los que se administraron composiciones de linfocitos T CAR<sup>+</sup>, divididos en grupos a los que se administraron composiciones que contenían un porcentaje de linfocitos T CCR7<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> CAR<sup>+</sup> entre linfocitos T CD4<sup>+</sup> CAR<sup>+</sup> (**FIG. 2A** para la supervivencia sin progresión, **FIG. 2C** para la duración de la respuesta) y entre linfocitos T CD8<sup>+</sup> CAR<sup>+</sup> (**FIG. 2B** para la supervivencia sin progresión, **FIG. 2D** para la duración de la respuesta) que está por encima o por debajo de un determinado nivel umbral.

La **FIG. 3** muestra la clonalidad de los linfocitos T de las composiciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> aislados antes de la genomodificación (CMAT) y de las composiciones de linfocitos T CAR<sup>+</sup> terapéuticos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> después de la genomodificación (se aplica el índice de Shannon).

### I. MÉTODOS PARA INCUBAR (P. EJ., ESTIMULAR) LINFOCITOS T

En el presente documento se desvelan métodos para incubar (p. ej., estimular) células en el proceso de preparación de células para terapia celular adoptiva, y composiciones y células producidas por los métodos. En algunos casos, las células incluyen normalmente linfocitos T, que en algunos casos expresan receptores de antígenos genomodificados, tales como receptores de linfocitos T (TCR) recombinantes o genomodificados y receptores funcionales de antígenos que no son TCR, tales como receptores quiméricos para el antígeno (CAR).

En algunos casos, se desvela un método para incubar (p. ej., estimular) linfocitos T, que incluye, incubar, en condiciones estimulantes, una composición de entrada que contiene una población de linfocitos T que comprende linfocitos T de tipo indiferenciado y linfocitos T de tipo no indiferenciado, conteniendo dicha composición de entrada una cantidad iniciadora de cultivo de los linfocitos T de tipo indiferenciado o de un subconjunto de linfocitos T CD8<sup>+</sup> de los mismos, produciendo de este modo una composición estimulada. En algunos aspectos, las condiciones estimulantes inducen preferentemente la ampliación o proliferación de los linfocitos T de tipo indiferenciado en comparación con los linfocitos T de tipo no indiferenciado de la composición estimulada. En algunos casos, el método incluye además la introducción en la composición celular estimulada de un ácido nucleico que codifica un receptor



recombinante genomodificado, en donde el método genera de este modo una composición de salida que comprende linfocitos T que expresan el receptor recombinante genomodificado. En algunos aspectos, la introducción se realiza durante al menos una parte de la incubación o se realiza después de la incubación. En algunos casos, antes de la incubación, las células de la composición de entrada no se han sometido, y no se someten, a una etapa de selección basada en un marcador endógeno de la superficie de linfocitos T que diferencia entre linfocitos T de tipo indiferenciado y linfocitos T de tipo no indiferenciado.

En algunos casos del método desvelado, la introducción de un ácido nucleico que codifica un receptor recombinante genomodificado se realiza antes, durante y/o después de la introducción de un ácido nucleico que codifica un receptor recombinante genomodificado. En algunos casos, el método incluye la incubación de la composición en condiciones estimulantes antes de introducir un ácido nucleico que codifica un receptor recombinante genomodificado. En algunos casos, el método incluye la incubación de la composición en condiciones estimulantes durante la introducción de un ácido nucleico que codifica un receptor recombinante genomodificado. En algunos casos, el método incluye la incubación de la composición en condiciones estimulantes después de la introducción de un ácido nucleico que codifica un receptor recombinante genomodificado.

En determinados casos, la condición estimulante comprende una superficie, tal como una perla magnética, que tiene unidos a la misma uno o más agentes que se unen a una parte de la superficie celular. En un caso, la superficie tiene unidos a la misma al menos anticuerpos anti-CD3. En otro caso, la superficie tiene unidos a la misma anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28. En algunos casos, al menos una parte sustancial de al menos una población de linfocitos T en la composición de entrada, se elimina después de aproximadamente la incubación. En un caso, la proporción entre células y perlas en las condiciones estimulantes es de aproximadamente 50:1 a aproximadamente 5:1. En determinados casos, la proporción es de aproximadamente 100:1 a aproximadamente 1:1. En algunos casos, la proporción es de aproximadamente 1:1 a 1:50. En determinados casos, la proporción es de al menos aproximadamente 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 o 1:10. En un caso particular, la proporción es de aproximadamente 3:1. En un caso particular, la proporción es de aproximadamente 1:3.

En algunos casos de los métodos desvelados en el presente documento, las condiciones de cultivo inducen preferentemente la proliferación, estimulación y/o activación de linfocitos T de tipo no indiferenciado en comparación con los linfocitos T de tipo indiferenciado. En algunos casos, los métodos de incubación (p. ej., estimulación) generan una composición de salida deseada, comprendida por un número deseado de células procedentes de linfocitos T de tipo indiferenciado de la composición de entrada. En algunos casos de uso del método de estimulación de linfocitos T descrito en el presente documento, de la células de la composición de entrada, un mayor porcentaje de los linfocitos T de tipo indiferenciado, en comparación con los linfocitos T de tipo no indiferenciado, se induce a proliferar y/o a ampliarse. En algunos aspectos, la composición estimulada resultante de los métodos de estimulación descritos en el presente documento, contiene menos del 10 % de células procedentes de linfocitos T de tipo no indiferenciado. En algunos ejemplos, la composición estimulada contiene menos del 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 % o 0,1 % de células procedentes de linfocitos T no indiferenciados. En algunos casos, un mayor porcentaje de los linfocitos T que eran de tipo indiferenciado en la composición de entrada, en comparación con el porcentaje de los linfocitos T que eran de tipo no indiferenciado en la composición de entrada, se divide los días 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 después de iniciar dicha incubación. En algunos casos, las condiciones estimulantes del método para estimular linfocitos T inducen la muerte celular en subpoblaciones de células particulares. En ejemplos particulares, las condiciones estimulantes del método inducen la activación de linfocitos T de tipo no indiferenciado, induciendo de este modo la muerte celular inducida por activación (MCIA).

En un aspecto, el método activa preferentemente linfocitos T de tipo no indiferenciado de la composición de entrada, induciendo de este modo la muerte celular de linfocitos T de tipo no indiferenciado de la composición de entrada, eliminando de este modo de la composición estimulada los linfocitos T procedentes de linfocitos T de tipo no indiferenciado de la composición de entrada. Al mismo tiempo, las células deseadas que quedan, p. ej., aquellas células que proceden de los linfocitos T de tipo indiferenciado de la composición de entrada, se activan, sobreviven y se estimulan para ampliarse, dando lugar de este modo a una población de células activadas de la que se ha eliminado al menos una parte sustancial de subpoblaciones no deseadas de linfocitos T. Adicionalmente, las condiciones de incubación (p. ej., estimulación) proporcionadas por los métodos descritos en el presente documento, restablecen la policlonalidad de la población de linfocitos T con respecto a los genes de TCR expresados, tal como indica el análisis de espectratipos u otros métodos de cuantificación de la clonalidad. En algunos casos, la firma de las células en la composición de salida procedentes de linfocitos T de tipo indiferenciado de la composición de entrada, se indica mediante la expresión de marcadores específicos.

#### **A. Composición de entrada**

En los métodos desvelados para incubar (p. ej., estimular) linfocitos T, el método incluye, incubar, en condiciones estimulantes, una composición de entrada que comprende una población de linfocitos T. La composición de entrada, en algunos aspectos, comprende una población de linfocitos T, de tal manera que comprende linfocitos T de tipo indiferenciado y linfocitos T de tipo no indiferenciado. En algunos casos, la población de linfocitos T comprende linfocitos CD4+ y/o CD8+. En algunos casos, la composición de entrada comprende una cantidad iniciadora de cultivo

de células. En algunos casos, la cantidad iniciadora de cultivo de células se basa en la cantidad de linfocitos T de tipo indiferenciado o de un subconjunto de linfocitos T CD8+ de los mismos en la composición de entrada. En algunos aspectos, subconjuntos específicos de linfocitos T, tales como linfocitos T de tipo indiferenciado y/o linfocitos T de tipo no indiferenciado, pueden identificarse utilizando formar o marcadores específicos. En algunos ejemplos específicos, la expresión de marcadores de superficie celular se utiliza para evaluar y/o identificar subconjuntos de linfocitos T. En algunos aspectos, la clonalidad de la composición de entrada puede caracterizarse.

En algunos aspectos, la composición de las células que se incuban/genomodifican, tal como la composición de entrada, no ha sido ni es objeto de una selección previa de linfocitos T de tipo indiferenciado. En algunos casos, el método no comprende selección positiva ni negativa ni el enriquecimiento de las células de tipo indiferenciado de la composición de entrada. En algunos aspectos, la composición de células que se estimula y/o genomodifica, tal como la composición de entrada y/o la composición estimulada, no ha sido ni es objeto de tal selección antes de la incubación (p. ej., estimulación). En algunos casos, antes de la incubación, las células no se han sometido ni se someten a una fase de selección basada en el nivel o en la presencia de un marcador de superficie de linfocitos T que diferencia entre linfocitos T de tipo indiferenciado y no indiferenciado, tales como CD27, CD28, CD45RA, CD45RO, CD56, CD62L, CD95, KLRG1 o CCR7. Por ejemplo, en algunos aspectos, las células de la composición de entrada no se han sometido a selección basada en la expresión de, o basada en la expresión superficial de, dicho marcador, antes de la incubación en las condiciones estimulantes. En algunos aspectos, las células de la composición estimulada no se someten a selección basada en la expresión de, o basada en la expresión superficial de, dicho marcador, antes de la genomodificación, p. ej., incubación con el ácido nucleico. En algunos aspectos, la incubación de la composición de entrada se lleva a cabo sin selección basada en la expresión superficial de un marcador para enriquecer los linfocitos T de tipo indiferenciado.

En algunos casos, los métodos comprenden menos etapas de selección en comparación con otros métodos, p. ej., no implican la selección de subconjuntos de linfocitos T, por lo que son más sencillos y presentan ventajas de ahorro de costes y/o recursos en comparación con los métodos de selección multietapa. En algunos casos, los métodos no incluyen el enriquecimiento basándose en la expresión de marcadores característicos de linfocitos T de memoria o en un subconjunto de los mismos y/o en linfocitos T de tipo indiferenciado. En algunos aspectos, la composición de las células que se están incubando (p. ej., estimulando), tal como la composición de entrada y/o la composición estimulada, no ha sido ni es objeto de tal selección.

En algunos ejemplos, los métodos no comprenden selección positiva basándose en un marcador que sea característico de linfocitos T de tipo no indiferenciado o que distinga subpoblaciones específicas de linfocitos T, tales como CD62L, CCR7, CD27, CD28, CD56, CD3, CD122, CD95, CD25, IL7-R $\alpha$  y/o CD127. En algunos ejemplos, los métodos no comprenden selección positiva ni enriquecimiento basándose en la expresión de CD62L, CCR7, CD27, CD28, CD56, CD3, CD122, CD95, CD25, IL7-R $\alpha$  y/o CD127. En algunos casos, los métodos no usan muestras ni composiciones que se hayan enriquecido ni seleccionado positivamente basándose en dichos marcadores o para enriquecer subtipos específicos.

En algunos casos, los métodos no comprenden etapas de selección basadas en afinidad, diseñadas para separar o distinguir entre linfocitos T de tipo indiferenciado y de tipo no indiferenciado. En algunos ejemplos, los métodos no comprenden selección positiva basada en un marcador que sea característico de células de tipo indiferenciado o de tipo no indiferenciado, o que distinga unas de otras, tales como CD27, CD28, CD45RO, CD45RA, CD56, CCR7, CD95, KLRG1 y/o CD62L. En algunos ejemplos, los métodos no comprenden selección positiva ni enriquecimiento basándose en la expresión de dichos marcadores. En algunos casos, los métodos no usan muestras ni composiciones que se hayan enriquecido o seleccionado positivamente basándose en dichos marcadores o para enriquecer dichos subtipos.

### **Células**

En algunos casos, los métodos desvelados en el presente documento incluyen una o más etapas para preparar una composición de entrada de células en la que está contenida una cantidad iniciadora de cultivo de linfocitos T de tipo indiferenciado, tal como en relación con un método que incluye una o más etapas de estimulación, ampliación, proliferación y/o genomodificación, p. ej. transducción, de células. Las células generalmente son células eucariotas, tales como células de mamífero, y normalmente son células humanas. La composición de entrada puede producirse o generarse mediante diversos métodos que implican el aislamiento o la selección de células a partir de una muestra biológica. En algunos casos, la composición de entrada contiene linfocitos CD4+ y/o CD8+ procedentes de una muestra biológica, como los que se obtienen o proceden de uno o más etapas de aislamiento, selección o enriquecimiento. En algunos ejemplos específicos, una proporción entre las células CD4+ y las células CD8+ del cultivo de entrada es o es aproximadamente de 1:1, 1:2, 2:1, 1:3 o 3:1. En algunos casos, la composición de entrada que contiene linfocitos T CD4+ y/o CD8+ aislados contiene una mezcla de linfocitos T de tipo indiferenciado y de linfocitos T de tipo no indiferenciado.

En algunos casos, las células de la composición de entrada que proceden de la sangre, de la médula ósea, de la linfa o de los órganos linfoides, son células del sistema inmunitario, tales como células del sistema inmunitario innato o adaptativo, incluidas las procedentes de muestras que contengan células mieloides o linfoides, incluidos linfocitos,

normalmente linfocitos T. Las células suelen ser células primarias, tales como las aisladas directamente de un sujeto y/o las aisladas de un sujeto y congeladas. En algunos casos, las células incluyen uno o más subconjuntos de linfocitos T u otros tipos de células, tales como poblaciones de linfocitos T completas, linfocitos CD4+, linfocitos CD8+ y subpoblaciones de los mismos, tales como los definidas por su función, estado de activación, madurez, potencial de diferenciación, ampliación, recirculación, ubicación y/o capacidad de persistencia, especificidad antigénica, tipo de receptor antigénico, presencia en un órgano o compartimento particular, perfil de marcadores o secreción de citocinas y/o grado de diferenciación. Con referencia al sujeto que se va a tratar, las células pueden ser alogénas y/o autólogas. Entre los métodos se incluyen métodos existentes. En algunos casos, los métodos incluyen aislar células del sujeto, prepararlas, procesarlas, cultivarlas y/o genomodificarlas, tal como se describe en el presente documento, y volverlas a introducir en el mismo paciente, antes o después de su crioconservación.

Entre los subtipos y subpoblaciones de linfocitos T y/o de linfocitos T CD4+ y/o CD8+, están los linfocitos T indiferenciados (*naïve T*,  $T_N$ ), los linfocitos T efectores ( $T_{EF}$ ), los linfocitos T de memoria y subtipos de los mismos, tales como linfocitos T madre de memoria (*stem cell memory T*,  $T_{SCM}$ ), linfocitos T de memoria central (*central memory T*,  $T_{CM}$ ), linfocitos T efectores de memoria (*effector memory T*,  $T_{EM}$ ) o linfocitos T efectores de memoria diferenciados terminalmente, linfocitos infiltrantes de tumor (*tumor-infiltrating lymphocytes*, TIL), linfocitos T inmaduros, linfocitos T maduros, linfocitos T auxiliares, linfocitos T citotóxicos, linfocitos T invariantes asociados a la mucosa (*mucosa-associated invariant T*, MAIT), linfocitos T reguladores (Treg) adaptativos y de origen natural, linfocitos T auxiliares, tales como linfocitos TH1, linfocitos TH2, linfocitos TH3, linfocitos TH17, linfocitos TH9, linfocitos TH22, linfocitos T auxiliares foliculares, linfocitos T alfa/beta y linfocitos T delta/gamma. En algunos casos, la célula es un linfocito T regulador (Treg). En algunos casos, la célula comprende además una proteína FOXP3 recombinante o una variante de la misma.

En algunos casos, la preparación de las células genomodificadas incluye una o más etapas de cultivo y/o preparación. Para su genomodificación, las células pueden aislarse de una muestra, tal como de una muestra biológica, p. ej., de una muestra obtenida o procedente de un sujeto. En algunos casos, 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 administrará la terapia celular. En algunos casos, el sujeto es un ser humano que necesita una intervención terapéutica particular, tal como la terapia celular adoptiva para la que se aíslan, procesan y/o genomodifican las células.

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

En algunos aspectos, la muestra de la que se obtienen o aíslan las células es sangre o una muestra procedente de sangre, o es o se obtiene de un producto de aféresis o leucocitaféresis. Las muestras ilustrativas incluyen sangre completa, células mononucleares de sangre periférica (CMSP), leucocitos, médula ósea, timo, biopsia de tejido, tumor, leucemia, linfoma, ganglio linfático, tejido linfoide asociado al intestino, tejido linfoide asociado a mucosas, bazo, otros tejidos linfoides, hígado, pulmón, estómago, intestino, colon, riñón, páncreas, mama, hueso, próstata, cuello uterino, testículos, ovarios, amígdala u otro órgano y/o células procedentes de los mismos. Las muestras incluyen, en el contexto de terapia celular, p. ej., terapia celular adoptiva, muestras de fuentes autólogas y alogénas.

En algunos casos, las células proceden de estirpes celulares, p. ej., estirpes de linfocitos T. En algunos casos, las células se obtienen de una fuente xenógena, por ejemplo, de ratón, rata, primate no humano o cerdo.

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

En algunos ejemplos, se obtienen células de la sangre en circulación de un sujeto, p. ej., mediante aféresis o leucocitaféresis. Las muestras, en algunos aspectos, contienen linfocitos, incluyendo linfocitos T, monocitos, granulocitos, linfocitos B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y/o plaquetas, y en algunos aspectos, contienen células distintas de glóbulos rojos y plaquetas.

En algunos casos, las células sanguíneas extraídas del sujeto se lavan, p. ej., para eliminar la fracción de plasma y colocar las células en un tampón o medio adecuado para las etapas de procesamiento posteriores. En algunos casos, las células se lavan con solución salina tamponada con fosfato (PBS, *phosphate buffered saline*). En algunos casos, la solución de lavado carece de calcio y/o magnesio y/o de muchos o de todos los cationes divalentes. En algunos aspectos, una etapa de lavado se lleva a cabo en una centrífuga de "flujo continuo" semiautomática (por ejemplo, el

procesador de células Cobe 2991, Baxter) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En algunos aspectos, una etapa de lavado se lleva a cabo mediante filtración de flujo tangencial (FFT) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En algunos casos, después del lavado, las células se resuspenden en una diversidad de tampones biocompatibles, tal como, por ejemplo, PBS sin  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ . En determinados casos, los componentes de una muestra de células sanguíneas se eliminan y las células se resuspenden directamente en el medio de cultivo.

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

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

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

No es necesario que la separación dé como resultado un enriquecimiento o eliminación del 100 % de una población celular particular o de células que expresen un marcador particular. Por ejemplo, la selección positiva de células de un tipo particular o su enriquecimiento, tales como las que expresan un marcador, se refiere al aumento del número o porcentaje de dichas células, pero no tiene por qué dar lugar a una ausencia completa de células que no expresen el marcador. Asimismo, la selección negativa, la eliminación o el empobrecimiento de células de un tipo particular, tales como las que expresan un marcador, se refieren a disminuir el número o porcentaje de dichas células, pero no tiene por qué dar lugar a una eliminación completa de todas esas células.

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

Por ejemplo, en algunos aspectos, subpoblaciones específicas de linfocitos T, tal como células positivas o que expresan altos niveles de uno o más marcadores de superficie, p. ej., los linfocitos T  $\text{CD}28^+$ ,  $\text{CD}62\text{L}^+$ ,  $\text{CCR}7^+$ ,  $\text{CD}27^+$ ,  $\text{CD}127^+$ ,  $\text{CD}4^+$ ,  $\text{CD}8^+$ ,  $\text{CD}56^+$ ,  $\text{CD}45\text{RA}^+$ ,  $\text{CD}95^{\text{hi}}$  y/o  $\text{CD}45\text{RO}^+$ , se aíslan mediante técnicas de selección positiva o negativa.

Por ejemplo, los linfocitos T  $\text{CD}3^+$ ,  $\text{CD}28^+$  pueden seleccionarse positivamente utilizando perlas magnéticas conjugadas con anti-CD3/anti-CD28 (p. ej., DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T Cell Expander).

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

En algunos casos, los linfocitos T se separan de una muestra de CMSP mediante la selección negativa de marcadores expresados en células que no son linfocitos T, tales como linfocitos B, monocitos u otros glóbulos blancos, tal como CD14. En algunos aspectos, se usa una etapa de selección de  $\text{CD}4^+$  o  $\text{CD}8^+$  para separar linfocitos T  $\text{CD}4^+$  auxiliares y linfocitos T  $\text{CD}8^+$  citotóxicos. Dichas poblaciones de  $\text{CD}4^+$  y  $\text{CD}8^+$  pueden clasificarse adicionalmente en subpoblaciones mediante la selección positiva o negativa de marcadores expresados o expresados a un grado relativamente más alto en una o más subpoblaciones de linfocitos T indiferenciados, de memoria y/o efectoras.

En algunos casos, los linfocitos  $\text{CD}8^+$  se enriquecen también con, o se empobrecen de, células madre indiferenciadas

de memoria central, memoria efectora y/o memoria central, tal como mediante selección positiva o negativa basándose en antígenos de superficie asociados a la subpoblación respectiva. En algunos casos, el enriquecimiento de los linfocitos T de memoria central ( $T_{CM}$ ) se lleva a cabo para aumentar la eficacia, tal como para mejorar la supervivencia a largo plazo, la ampliación y/o el injerto después de la administración, que en algunos aspectos es particularmente sólido 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, la combinación de linfocitos  $CD8^+$  y linfocitos T  $CD4^+$  enriquecidos en  $T_{CM}$  mejora adicionalmente su eficacia.

En unos casos, los linfocitos T de memoria están presentes en los subconjuntos  $CD62L^+$  y  $CD62L^-$  de linfocitos  $CD8^+$  de sangre periférica. Las CMSP pueden enriquecerse con, o empobrecerse de, fracciones  $CD62L^-CD8^+$  y/o  $CD62L^+CD8^+$ , tal como usando anticuerpos anti- $CD8$  y anti- $CD62L$ .

En algunos casos, el enriquecimiento de los linfocitos T de memoria central ( $T_{CM}$ ) se basa en la expresión en superficie alta o positiva de  $CD45RO$ ,  $CD62L$ ,  $CCR7$ ,  $CD28$ ,  $CD3$  y/o  $CD127$ ; en algunos aspectos, se basa en la selección negativa de células que expresan o expresan a alto grado  $CD45RA$  y/o granzima B. En algunos aspectos, el aislamiento de una población de  $CD8^+$  enriquecida para linfocitos  $T_{CM}$  se lleva a cabo mediante el empobrecimiento de células que expresan  $CD4$ ,  $CD14$ ,  $CD45RA$  y selección positiva o enriquecimiento de células que expresan  $CD62L$ . En un aspecto, el enriquecimiento de linfocitos T de memoria central ( $T_{CM}$ ) se lleva a cabo a partir de una fracción negativa de células seleccionadas basándose en la expresión de  $CD4$ , que se somete a una selección negativa basada en la expresión de  $CD14$  y  $CD45RA$ , y una selección positiva basada en  $CD62L$ . En algunos aspectos, dichas selecciones se realizan de forma simultánea y en otros aspectos de forma secuencial, en cualquier orden. En algunos aspectos, 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  $CD4$  se conserven y usen en las etapas de los métodos posteriores, opcionalmente después de una o más etapas de selección positiva o negativa adicionales.

En un ejemplo particular, una muestra de CMSP u otra muestra de glóbulos blancos se somete a selección de linfocitos  $CD4^+$ , donde se conservan las fracciones tanto negativas como positivas. Después, la fracción negativa se somete a una selección negativa basada en la expresión de  $CD14$  y  $CD45RA$  o  $ROR1$ , y a una selección positiva basada en un marcador característico de los linfocitos T de memoria central, tal como  $CD62L$  o  $CCR7$ , donde las selecciones positivas y negativas se llevan a cabo en cualquier orden.

Los linfocitos T auxiliares  $CD4^+$  se clasifican en linfocitos indiferenciados de memoria central y efectores mediante la identificación de poblaciones celulares que tienen antígenos de superficie celular. Los linfocitos  $CD4^+$  se pueden obtener mediante métodos convencionales. En algunos casos, los linfocitos T  $CD4^+$  indiferenciados son linfocitos T  $CD45RO^-$ ,  $CD45RA^+$ ,  $CD62L^-$ ,  $CD4^+$ . En algunos casos, los linfocitos  $CD4^+$  de memoria central pueden ser  $CD62L^+$  y  $CD45RO^+$ . En algunos casos, los linfocitos  $CD4^+$  efectores son  $CD62L^-$  y  $CD45RO^-$ .

En un ejemplo, para el enriquecimiento en células  $CD4^+$  por selección negativa, un cóctel de anticuerpos monoclonales normalmente incluye anticuerpos contra  $CD14$ ,  $CD20$ ,  $CD11b$ ,  $CD16$ ,  $HLA-DR$  y  $CD8$ . En algunos casos, el anticuerpo o compañero de unión está unido 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, las células y las poblaciones de células se separan o aíslan mediante técnicas de separación inmunomagnéticas (o magnéticas por afinidad) (revisadas en *Methods in Molecular Medicine*, vol. 58: *Metastasis Research Protocols*, Vol. 2: *Cell Behavior In vitro and In vivo*, págs. 17-25 Editado por: S. A. Brooks y U. Schumacher © Humana Press Inc., Totowa, NJ).

En algunos aspectos, 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 (p. ej., tal como perlas Dynabeads o MACS). El material magnéticamente sensible, p. ej., partícula, generalmente está unido directa o indirectamente a un compañero de unión, p. ej., un anticuerpo, que se une específicamente a una molécula, p. ej., un marcador de superficie, presente en la célula, células, o población de células que se desea separar, p. ej., que se desea seleccionar negativa o positivamente.

En algunos casos, la partícula o perla magnética comprende un material magnéticamente sensible unido a un compañero de unión específico, tal como un anticuerpo u otro compañero de unión. En algunos aspectos, pueden usarse materiales magnéticamente sensible utilizados en métodos de separación magnética. Las partículas magnéticas adecuadas incluyen las descritas en Molday, Patente de los EE. UU. N.º 4.452.773 y en la Memoria descriptiva de patente europea EP 452342 B. Las partículas de tamaño coloidal, tales como las descritas en la patente de los EE. UU. N.º 4.795.698 de Owen y en Liberti *et al.*, Patente de EE.UU. 5.200.084, son otros ejemplos.

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

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

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

En algunos casos, las partículas magnéticamente sensibles se dejan adheridas a las células que posteriormente se incubarán, cultivarán y/o genomodificarán; en algunos aspectos, las partículas se dejan adheridas a las células para su administración a un paciente. En algunos casos, las partículas magnetizables o magnéticamente sensibles se eliminan de las células. Los métodos para eliminar las partículas magnetizables de las células pueden incluir, p. ej., el uso de anticuerpos no marcados competidores, partículas magnetizables o anticuerpos conjugados con enlazadores escindibles, etc. En algunos casos, las partículas magnetizables son biodegradables.

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

En determinados casos, el aislamiento o separación se realiza usando un sistema, dispositivo o aparato que realiza una o más de las etapas de aislamiento, preparación celular, separación, procesamiento, incubación, cultivo y/o formulación de los métodos. En algunos aspectos, el sistema se utiliza para realizar cada una de estas etapas en un entorno cerrado o aséptico, por ejemplo, para minimizar el error, la manipulación y/o contaminación por parte del usuario. En un ejemplo, el sistema es un sistema como se describe en la publicación PCT Internacional n.º WO2009/072003 o en el documento US 20110003380 A1.

En algunos casos, el sistema o aparato realiza una o más, p. ej., todas, las etapas de aislamiento, procesamiento, genomodificación y formulación en un sistema integrado o autónomo, y/o de forma automatizada o programable. En algunos aspectos, el sistema o aparato incluye un ordenador y/o un programa informático en comunicación con el sistema o aparato, que permite a un usuario programar, control, evaluar el resultado de, y/o ajustar, diversos aspectos de las etapas de procesamiento, aislamiento, genomodificación y formulación.

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

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

y no quedan retenidas en la columna. En algunos casos, las poblaciones de células para su uso con los métodos descritos en el presente documento están marcadas y quedan retenidas en la columna. En algunos casos, las poblaciones de células para su uso con los métodos descritos en el presente documento se eluyen de la columna después de la eliminación del campo magnético y se recogen dentro de la bolsa de recogida de células.

En determinados casos, la separación y/u otras etapas se llevan a cabo utilizando el sistema CliniMACS Prodigy (Miltenyi Biotec). El sistema CliniMACS Prodigy, en algunos aspectos, está equipado con una unidad de procesamiento de células que permite el lavado y el fraccionamiento automatizados de las células por centrifugación. El sistema CliniMACS Prodigy también puede incluir una cámara integrada y un programa informático de reconocimiento de imágenes que determina el criterio de valoración de fraccionamiento celular óptimo al discernir las capas macroscópicas del producto de la célula fuente. Por ejemplo, la sangre periférica puede separarse automáticamente en eritrocitos, glóbulos blancos y capas de plasma. El sistema CliniMACS Prodigy también puede incluir una cámara de cultivo celular integrada que cumple protocolos de cultivo celular tales como, p. ej., diferenciación y ampliación celular, carga de antígeno y cultivo celular prolongado. Los puertos de entrada pueden permitir la eliminación aséptica y el reabastecimiento de los medios y las células pueden controlarse usando un microscopio integrado. Véase, p. ej., Klebanoff *et al.* (2012) *J Immunother.* 35(9): 651-660, Terakura *et al.* (2012) *Blood* 117:72-82 y Wang *et al.* (2012) *J Immunother.* 35(9):689-701.

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

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

En algunos casos, los métodos de preparación incluyen etapas para congelar, p. ej., criopreservar, las células, ya sea antes o después del aislamiento, incubación y/o genomodificación. En algunos casos, la etapa de congelación y descongelación posterior elimina los granulocitos y, hasta cierto punto, los monocitos, en la población celular. En algunos casos, las células se suspenden en una solución de congelación, p. ej., después de una etapa de lavado para eliminar el plasma y las plaquetas. En algunos aspectos, puede usarse cualquiera de las diversas soluciones y parámetros de congelación conocidos. Un ejemplo implica el uso de PBS que contiene un DMSO al 20 % y seroalbúmina humana (HSA, *human serum albumin*) al 8 % u otros medios de congelación de células adecuados. Esto después se diluye a 1:1 con medio de manera que la concentración final de DMSO y HSA sea del 10 % y del 4 %, respectivamente. Después, las células se congelan a -80 °C a una velocidad de 1° por minuto y se conservan en la fase de vapor de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido.

#### a. Linfocitos T de tipo indiferenciado

En algunos casos, el método comprende incubar una composición de entrada que comprende linfocitos T de tipo indiferenciado o una determinada cantidad umbral de linfocitos T de tipo indiferenciado. Un aspecto de los métodos presentes proporciona una composición de entrada que se ha evaluado con respecto a subpoblaciones de células basadas en la expresión de una variedad de marcadores, tales como CD27, CD28, CD56, CD62L, CD95, KLRG1, CD45RA o CD45RO, citocinas (p. ej., IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10), receptores de citocinas (p. ej., CD25), perforina, moléculas de adhesión (p. ej., VLA-1, VLA-2, VLA-4, LPAM-1, LFA-1), y/o moléculas de asentamiento (p. ej., L-Selectina), antes de la incubación (es decir, de la estimulación). Para identificar linfocitos T de tipo indiferenciado, en algunos casos, pueden utilizarse varias firmas de linfocitos T de tipo indiferenciado. En algunos casos, puede evaluarse la expresión de marcadores particulares de linfocitos T de tipo indiferenciado. Como ejemplos, en algunos casos, los linfocitos T de tipo indiferenciado son positivos en superficie para un marcador, incluidos los marcadores de activación de linfocitos T, seleccionados del grupo que consiste en CD27, CD28, CD45RA, CD62L y CCR7. En algunos aspectos, los linfocitos T de tipo indiferenciado son negativos en superficie para CD56 y/o CD45RO. En algunos aspectos, los linfocitos T de tipo indiferenciado son negativos en superficie para CD45RO y positivos en superficie para CD27, CD45RA y CCR7. En algunos casos, los linfocitos T de tipo indiferenciado son negativos para la expresión intracelular de una citocina tal como la IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4 y/o IL-10. En otros ejemplos, los linfocitos T de tipo indiferenciado son negativos para la expresión de los marcadores CD25 y/o perforina. En algunos casos, los linfocitos

T de tipo indiferenciado son CD95<sup>lo</sup>.

Para evaluar la expresión de los marcadores de linfocitos T de tipo indiferenciado, el método incluye en algunos casos la detección de los marcadores realizando un ensayo *in vitro*. En algunos ejemplos, el ensayo *in vitro* es un  
 5 inmunoensayo, un ensayo basado en aptámeros, un ensayo histológico o citológico, o un ensayo del nivel de expresión del ARNm. En algunos casos, el ensayo *in vitro* utilizado puede ser un ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA), inmunotransferencia, inmunofenotipificación, inmunoprecipitación, radioinmunoensayo (RIA), inmunotinción, citometría de flujo, resonancia de plasmón superficial (SPR, *surface plasmon resonance*), quimioluminiscencia,  
 10 inmunoensayo de flujo lateral, ensayo de inhibición o ensayo de afección. En algunos casos, la expresión de marcadores de linfocitos T de tipo indiferenciado se determina mediante RNA-seq (secuenciación de ARN).

Los linfocitos T de tipo indiferenciado de la composición de entrada también pueden evaluarse con respecto a la clonalidad de los linfocitos T. En algunos casos, la evaluación de la clonalidad de la población de linfocitos T es una  
 15 evaluación de la diversidad clonal de la población de linfocitos T. En algunos casos, los linfocitos T de tipo indiferenciado son policlonales o multiclinales. La policlonalidad de dicha composición de entrada de linfocitos T se mide por la amplitud de la respuesta de la población a un antígeno determinado. En algunos aspectos, la composición de entrada puede evaluarse midiendo el número de epítopos diferentes reconocidos por las células específicas de antígeno. Esto puede llevarse a cabo utilizando técnicas estándar para generar y clonar linfocitos T específicos de antígeno *in vitro*. En algunos casos, los linfocitos T de tipo indiferenciado son policlonales (o multiclinales) sin que  
 20 predomine una única población clonotípica en la población de linfocitos T de tipo indiferenciado.

En el contexto de una población de linfocitos T, tal como de la composición de entrada, en algunos aspectos, la firma de policlonalidad se refiere a una población de linfocitos T que tiene una especificidad antigénica múltiple y amplia. En  
 25 algunos casos, la policlonalidad se refiere a una población de linfocitos T que presenta una gran diversidad en el repertorio de TCR. En algunos casos, la diversidad del repertorio de TCR se debe a acontecimientos de recombinación V(D)J que, en algunos aspectos, se desencadenan por acontecimientos de selección frente a antígenos propios y extraños. En algunos casos, una población de linfocitos T que es diversa o policlinal es una población de linfocitos T en la que el análisis indica la presencia de una pluralidad de transcritos o productos de TCR variados o diferentes presentes en la población. En algunos casos, una población de linfocitos T que presenta una clonalidad alta o  
 30 relativamente alta es una población de linfocitos T en la que el repertorio de TCR es menos diverso. En algunos casos, los linfocitos T son oligoclonales si el análisis indica la presencia de varios, tal como dos o tres, transcritos o productos de TCR en una población de linfocitos T. En algunos casos, los linfocitos T son monoclonales si el análisis indica la presencia de un único transcrito o producto de TCR en una población de linfocitos T.

La clonalidad de las células en la composición de entrada, tal como es el caso de los linfocitos T de tipo indiferenciado, en algunos ejemplos, se determina mediante secuenciación clonal, opcionalmente, secuenciación de nueva  
 35 generación, o análisis de espectratipos. En algunos aspectos, pueden emplearse métodos de secuenciación de nueva generación, usando ADN genómico o ADNc de linfocitos T, para evaluar el repertorio de TCR, incluidas las secuencias que codifican la región 3 determinante de la complementariedad (CDR3). En algunos casos, puede emplearse  
 40 secuenciación del transcriptoma completo mediante RNA-seq. En algunos casos, pueden utilizarse métodos de secuenciación unicelular.

En algunos casos, la policlonalidad puede evaluarse o determinarse mediante análisis de espectratipos (una medición del repertorio de la región hipervariable de las cadenas V $\beta$ , V $\alpha$ , V $\gamma$  o V $\delta$  del TRC). Una población de linfocitos T se  
 45 considera policlinal cuando el perfil de espectratipos de V $\beta$  de una familia de V $\beta$ , V $\alpha$ , V $\gamma$  o V $\delta$  del TCR determinada, tiene múltiples picos, normalmente 5 o más picos predominantes y en la mayoría de los casos con distribución gaussiana. La policlonalidad también puede definirse mediante la generación y caracterización de clones específicos de antígeno para un antígeno de interés.

En algunos casos, los métodos para evaluar la clonalidad pueden incluir varias características de los métodos como se describe en la publicaciones internacionales n.º WO2012/048341, WO2014/144495, WO2017/053902,  
 50 WO2016044227, WO2016176322 y WO2012048340. En algunos casos, dichos métodos pueden usarse para obtener información de secuencia sobre un polinucleótido diana de interés dentro de una célula, tal como un TCR. Los genes diana pueden obtenerse a partir de ADN genómico o ARNm de una célula de una muestra o población de células. La muestra o población de células puede incluir células inmunitarias. Por ejemplo, para las moléculas de TCR diana, los genes que codifican cadenas de un TCR pueden obtenerse a partir de ADN genómico o ARNm de células inmunitarias o linfocitos T. En algunos casos, el material de partida es ARN procedente de linfocitos T compuesto por genes que  
 55 codifican una cadena de un TCR.

En algunos casos, el índice de Shannon se aplica a la clonalidad como un umbral para filtrar clones ("clonalidad ajustada por Shannon"), véase, Chaara *et al.* (2018) Front Immunol 9: 1038).

En algunos casos, los métodos desvelados promueven o dan lugar a un aumento de la policlonalidad de la población de linfocitos T o de un subconjunto de los mismos de la composición de entrada. En algunos casos, los métodos  
 65 desvelados promueven o dan lugar a un aumento de la diversidad de la población de linfocitos T o de un subconjunto de los mismos de la composición de entrada. En algunos casos, los linfocitos T, o un subconjunto de CD4 o CD8 de



los mismos, de una composición incubada o estimulada presentan una clonalidad reducida o disminuida en comparación con los linfocitos T, o el subconjunto de CD4 o CD8 de los mismos, en la composición de entrada antes de llevar a cabo los métodos. En algunos casos, el grado de clonalidad disminuye en más o menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces o más.

5 En un aspecto de los métodos desvelados, una población de linfocitos T de la composición de entrada se activa o estimula para inducir la apoptosis como se describe más adelante en la sección titulada "Incubación celular", eliminando de este modo la subpoblación de la población de células. Al mismo tiempo, las células deseadas que quedan, p. ej., las células de tipo indiferenciado, se activan y estimulan para su ampliación, dando lugar de este modo  
10 a una población de células activadas de la que se ha eliminado al menos una parte sustancial de subpoblaciones no deseadas de linfocitos T (tales como linfocitos T de tipo no indiferenciado). Como se ha mencionado anteriormente, la estimulación/activación, como se describe en el presente documento, puede llevarse a cabo en las células que quedan después de la exposición de una población de células directamente a composiciones pro-apoptóticas. Adicionalmente,  
15 la posterior estimulación y activación proporcionadas por la presente divulgación restablecen la policlonalidad de la población de linfocitos T con respecto a los genes de TCR expresados, tal como indican los métodos de análisis de espectratipos o secuenciación.

#### Cantidad iniciadora de cultivo

20 En aspectos de los métodos desvelados, la composición de entrada incluye una cantidad iniciadora de cultivo para la activación o ampliación preferencial de linfocitos T de tipo indiferenciado. En algunos casos, la cantidad iniciadora de cultivo incluye o se determina o se basa en el número de linfocitos T de tipo indiferenciado o de un subconjunto de linfocitos T CD8+ de los mismos, en la composición. Por tanto, en aspectos del método desvelado, la incubación (p. ej., estimulación) se lleva a cabo sin tener en cuenta el número total o el porcentaje de linfocitos T de tipo  
25 indiferenciado, siempre que en la composición de entrada haya una cantidad umbral o iniciadora de cultivo de linfocitos T de tipo indiferenciado.

En algunos casos de los métodos desvelados en el presente documento para incubar (p. ej., estimular) células, la cantidad iniciadora de cultivo de los linfocitos T de tipo indiferenciado o de un subconjunto de linfocitos T CD8+ de los  
30 mismos, es de, o de aproximadamente,  $0,1 \times 10^8$  a  $5 \times 10^8$ , de, o de aproximadamente,  $0,1 \times 10^8$  a  $4 \times 10^8$ , de, o de aproximadamente,  $0,1 \times 10^8$  a  $2 \times 10^8$ , de, o de aproximadamente,  $0,1 \times 10^8$  a  $1 \times 10^8$ , de, o de aproximadamente,  $1 \times 10^8$  a  $5 \times 10^8$ , de, o de aproximadamente,  $1 \times 10^8$  a  $4 \times 10^8$ , de, o de aproximadamente,  $1 \times 10^8$  a  $2 \times 10^8$ , de, o de aproximadamente,  $2 \times 10^8$  a  $5 \times 10^8$ , de, o de aproximadamente,  $2 \times 10^8$  a  $4 \times 10^8$  de los linfocitos T de tipo indiferenciado. En algunos casos, la cantidad iniciadora de cultivo de los linfocitos T de tipo indiferenciado o de un  
35 subconjunto de linfocitos T CD8+ de los mismos, es de al menos, o de al menos aproximadamente, o es o es de aproximadamente  $0,5 \times 10^8$ ,  $0,75 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1,5 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$  o  $4 \times 10^8$  de los linfocitos T de tipo indiferenciado. En algunos ejemplos, la cantidad iniciadora de cultivo de los linfocitos T de tipo indiferenciado o de un subconjunto de linfocitos T CD8+ de los mismos, es de al menos, o de al menos aproximadamente, o es o es de aproximadamente  $2 \times 10^8$  células.

40 En algunos casos de los métodos de incubación desvelados en el presente documento en las condiciones estimulantes descritas en el presente documento, una composición de entrada que comprende una población de linfocitos T que comprende linfocitos T de tipo indiferenciado y linfocitos T de tipo no indiferenciado, comprende una cantidad iniciadora de cultivo de, o de aproximadamente,  $1 \times 10^8$  a  $4 \times 10^8$  linfocitos T de tipo indiferenciado o de un subconjunto de  
45 linfocitos T CD8+ de los mismos. En algunos casos, los métodos producen de este modo una composición estimulada, en donde las condiciones estimulantes inducen preferentemente la ampliación o proliferación de los linfocitos T de tipo indiferenciado en comparación con los linfocitos T de tipo no indiferenciado de la composición estimulada. En algunos aspectos, la cantidad iniciadora de cultivo de los linfocitos T de tipo indiferenciado o de un subconjunto de linfocitos T CD8+ de los mismos, es de al menos, o de al menos aproximadamente, o es o es de aproximadamente  $2 \times 10^8$  células.  
50 En algunos casos, la cantidad de linfocitos T de tipo indiferenciado y de linfocitos T de tipo no indiferenciado de la composición de entrada, es aproximadamente la misma. En algunos casos, la cantidad iniciadora de cultivo es una cantidad de linfocitos T CD8+ indiferenciados. En algunos casos, la cantidad iniciadora de cultivo no tiene en cuenta la cantidad de linfocitos T de tipo no indiferenciado en la composición de entrada. En algunos aspectos, la cantidad de iniciadora de cultivo se determina basándose en el número de linfocitos T de tipo indiferenciado diana en la  
55 composición estimulada.

#### b. Linfocitos T de tipo no indiferenciado

60 En algunos casos, el método comprende incubar una composición de entrada que comprende una población de linfocitos T que comprende linfocitos T de tipo indiferenciado y linfocitos T de tipo no indiferenciado. En algunos casos, los linfocitos T de tipo no indiferenciado incluyen linfocitos T efectores ( $T_{EF}$ ), linfocitos T de memoria, linfocitos T de memoria central ( $T_{MC}$ ), linfocitos T efectores de memoria ( $T_{EM}$ ), y combinaciones de los mismos. Un aspecto de los presentes métodos proporciona una composición de entrada que se ha evaluado con respecto a poblaciones de células que expresan una variedad de marcadores, tales como CD27, CD28, CD56, CD62L, CD95, KLRG1, CD45RA  
65 o CD45RO, citocinas (p. ej., IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10), receptores de citocinas (p. ej., CD25), perforina, moléculas de adhesión (p. ej., VLA-1, VLA-2, VLA-4, LPAM-1, LFA-1), y/o moléculas de asentamiento (p. ej., L-Selectina), antes de

la incubación (es decir, de la estimulación). Para identificar linfocitos T de tipo no indiferenciado, en algunos casos, pueden utilizarse varias firmas de linfocitos T de tipo no indiferenciado. En algunos casos, puede evaluarse la expresión de marcadores particulares de linfocitos T de tipo no indiferenciado. Por ejemplo, en algunos casos, los linfocitos T de tipo no indiferenciado son negativos en superficie para un marcador, incluidos los marcadores de activación de linfocitos T, tales como CD27, CD28, CD45RA y CCR7; y en algunos casos, los linfocitos T de tipo no indiferenciado son positivos en superficie para un marcador, incluyendo CD62L. En algunos aspectos, los linfocitos T de tipo no indiferenciado son positivos en superficie para CD56 y/o CD45RO. En algunos aspectos, los linfocitos T de tipo no indiferenciado son positivos en superficie para CD45RO y negativos en superficie celular para CD27, CD45RA y CCR7. En algunos casos, los linfocitos T de tipo no indiferenciado son positivos para la expresión intracelular de una citocina tal como IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4 y/o IL-10. En otros ejemplos, los linfocitos T de tipo no indiferenciado son positivos para la expresión de los marcadores CD25 y/o perforina. En algunos casos, los linfocitos T de tipo no indiferenciado son CD95<sup>hi</sup>.

Para evaluar la expresión de los marcadores de linfocitos T de tipo no indiferenciado, el método incluye en algunos casos la detección de los marcadores realizando un ensayo *in vitro*. En algunos ejemplos, el ensayo *in vitro* es un inmunoensayo, un ensayo basado en aptámeros, un ensayo histológico o citológico, o un ensayo del nivel de expresión del ARNm. En algunos casos, el ensayo *in vitro* utilizado puede ser un ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA), inmunotransferencia, inmunoprecipitación, radioinmunoensayo (RIA), inmunotinción, citometría de flujo, resonancia de plasmón superficial (SPR), quimioluminiscencia, inmunoensayo de flujo lateral, ensayo de inhibición o ensayo de aidez. En algunos casos, la expresión de marcadores de linfocitos T de tipo no indiferenciado se determina mediante RNA-seq.

Los linfocitos T de tipo no indiferenciado de la composición de entrada también pueden evaluarse mediante la clonalidad de los linfocitos T. En algunos casos, los linfocitos T de tipo no indiferenciado son monoclonales. La clonalidad de dicha composición de entrada de linfocitos T se mide por la amplitud de la respuesta de la población a un antígeno determinado. En algunos casos, la monoclonalidad se refiere a una población de linfocitos T que tiene baja diversidad. En algunos aspectos, la composición de entrada puede evaluarse midiendo el número de epítomos diferentes reconocidos por las células específicas de antígeno. Esto puede llevarse a cabo utilizando técnicas estándar para generar y clonar linfocitos T específicos de antígeno *in vitro*. En algunos casos, los linfocitos T de tipo no indiferenciado presentan un predominio de un único patrón de reordenamiento del gen de TCR. La clonalidad de las células en la composición de entrada, tal como la de los linfocitos T de tipo no indiferenciado, en algunos ejemplos, se determina mediante secuenciación clonal, opcionalmente, secuenciación de nueva generación, o análisis de espectratipos.

En algunos casos, la evaluación de la clonalidad de la población de linfocitos T es una evaluación de la diversidad clonal de la población de linfocitos T. En algunos casos, una población de linfocitos T que es monoclonal se refiere a una población de linfocitos T que presenta baja diversidad. En el contexto de una población de linfocitos T, tal como de la composición de entrada, monoclonalidad se refiere a una población de linfocitos T que tiene una única especificidad definida mediante análisis de espectratipos (una medición del repertorio de la región hipervariable de la cadena V $\beta$ , V $\alpha$ , V $\gamma$ , o V $\delta$  del TCR). Una población de linfocitos T se considera monoclonal (o mono-específica) cuando el perfil de espectratipos de V $\beta$ , V $\alpha$ , V $\gamma$  y/o V $\delta$  de una familia de V $\beta$ , V $\alpha$ , V $\gamma$  y/o V $\delta$  del TCR determinada tiene un solo pico predominante. El análisis de espectratipos diferencia genes variables reordenados de un tamaño particular, no su secuencia. Por tanto, se entiende que un solo pico podría representar una población de linfocitos T que exprese uno cualquiera de un número limitado de genes variables del TCR reordenados (V $\beta$ , V $\alpha$ , V $\gamma$  o V $\delta$ ) que comprenda uno cualquiera de los 4 nucleótidos posibles (adenina (a), guanina (g), citosina (c) o timina (t)) o una combinación de los 4 nucleótidos en la región de unión. En determinados casos, puede ser deseable clonar y secuenciar una banda particular para determinar la(s) secuencia(s) del gen o genes variable(s) reordenado(s) presente(s) en la banda que representa una longitud particular.

En algunos casos, los métodos para evaluar la clonalidad pueden incluir varias características de los métodos como se describe en la publicaciones internacionales n.º WO2012/048341, WO2014/144495, WO2017/053902, WO2016044227, WO2016176322 y WO2012048340. En algunos casos, dichos métodos pueden usarse para obtener información de secuencia sobre un polinucleótido diana de interés dentro de una célula, tal como un TCR. Los genes diana pueden obtenerse a partir de ADN genómico o ARNm de una célula de una muestra o población de células. La muestra o población de células puede incluir células inmunitarias. Por ejemplo, para las moléculas de TCR diana, los genes que codifican cadenas de un TCR pueden obtenerse a partir de ADN genómico o ARNm de células inmunitarias o linfocitos T. En algunos casos, el material de partida es ARN procedente de linfocitos T compuesto por genes que codifican una cadena de un TCR. En algunos casos, el índice de Shannon se aplica a la clonalidad como un umbral para filtrar clones ("clonalidad ajustada por Shannon"), véase, Chaara *et al.* (2018) Front Immunol 9:1038).

Por consiguiente, entre los métodos para incubar (p. ej., estimular) linfocitos T en la preparación de linfocitos T genomodificados para terapia adoptiva, se encuentran los que utilizan condiciones que inducen preferentemente la ampliación y proliferación de células procedentes de linfocitos T de tipo indiferenciado (o procedentes de linfocitos T CD45RA+ o CD45RO-) en comparación con los procedentes de linfocitos T de tipo no indiferenciado (o procedentes de linfocitos T CD45RA- o CD45RO+). En algunos casos, los linfocitos T de tipo indiferenciado son CD45RA+, CD45RO-, CD27+ y CCR7+. En algunos casos, los linfocitos T de tipo no indiferenciado son CD45RA-, CD45RO+,

CD27- y CCR7-. En algunos casos, los métodos implican incubar linfocitos T en una composición iniciadora de cultivo en condiciones estimulantes que inducen preferentemente la expansión o proliferación de linfocitos T de tipo indiferenciado en comparación con linfocitos T de tipo no indiferenciado, generando de este modo una composición estimulada. Usando los métodos desvelados, la evaluación de la composición de entrada usando las firmas y los marcadores descritos anteriormente puede utilizarse como parte del método.

## B. Incubación celular

En algunos casos, los métodos desvelados incluyen etapas de cultivo, incubación y/o genomodificación de células en la composición de entrada, tal como de una composición de entrada que contenga una cantidad iniciadora de cultivo de linfocitos T de tipo indiferenciado. Por ejemplo, en algunos casos, se desvelan métodos para incubar y/o genomodificar una cantidad iniciadora de cultivo de las composiciones de entrada desveladas, en las que se encuentra un número umbral de linfocitos T de tipo indiferenciado como se ha descrito. La incubación y/o la genomodificación se pueden llevar a cabo en un recipiente de cultivo, tal como una unidad, cámara, pocillo, columna, tubo, conjunto de tubos, válvula, vial, placa de cultivo, bolsa u otro contenedor para el cultivo o cultivar células.

En algunos casos, las células se incuban y/o cultivar antes de o en relación con la genomodificación, tal como según cualquiera de los métodos descritos en la Sección II. Las etapas de incubación pueden incluir el cultivo, la estimulación, la activación y/o la propagación. En algunos casos, las composiciones o células se incuban en presencia de condiciones estimulantes o de un agente estimulador. Dichas condiciones incluyen las diseñadas para inducir la proliferación, ampliación, activación y/o supervivencia de células en la población, para imitar la exposición al antígeno y/o para preparar a las células para la genomodificación, tal como para la introducción de un receptor recombinante, p. ej., CAR.

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

En algunos casos, las condiciones estimulantes o agentes estimuladores incluyen uno o más agentes, p. ej., un ligando, que es capaz de activar un dominio de señalización intracelular de un complejo TCR. En algunos aspectos, el agente activa o inicia la cascada de señalización intracelular de TCR/CD3 en un linfocito T. Dichos agentes pueden incluir anticuerpos, tales como los específicos para un TCR, p. ej., anti-CD3. En algunos casos, las condiciones estimulantes incluyen uno o más agentes, p. ej., un ligando, capaz de estimular a un receptor coestimulador, p. ej., anti-CD28. En algunos casos, dichos agentes y/o ligandos pueden estar unidos a un soporte sólido, tal como a una perla y/o a una o más citocinas. Opcionalmente, el método de ampliación 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).

Los métodos desvelados incluyen generalmente la presencia, el diseño y/o el uso de condiciones estimulantes que induzcan preferentemente la ampliación o proliferación de los linfocitos T de tipo indiferenciado frente a los de tipo no indiferenciado, y/o que no induzcan preferentemente la ampliación o proliferación en linfocitos T de tipo no indiferenciado frente a los de tipo indiferenciado. En algunos aspectos, las condiciones incluyen agentes que inducen una señal activadora de tal manera que sólo los linfocitos T de tipo no indiferenciado presentes en la composición se activarán de una manera que se induzca la muerte celular. Dichas condiciones preferentes se utilizan normalmente en una fase anterior a la introducción de los ácidos nucleicos que codifican las moléculas genomodificadas, tales como los receptores de antígenos genomodificados.

Las condiciones incluyen, pero sin limitación, las diseñadas para inducir la proliferación, la ampliación, la activación y/o la supervivencia de células en la población. En algunos casos, las condiciones inducen una estimulación, p. ej., una activación, una señal suficiente para activar y/o inducir la proliferación o división de linfocitos T de tipo no indiferenciado o de un subconjunto de los mismos. Los linfocitos T de tipo indiferenciado suelen necesitar una señal mínima a través de TCR/CD3 para alcanzar un umbral de activación, por ejemplo, para activarse totalmente y entrar en el ciclo celular. Esta señal mínima es generalmente superior a la señal necesaria para inducir la activación/entrada en el ciclo celular en los linfocitos T de tipo no indiferenciado y/o en determinados subconjuntos de los mismos. Los linfocitos T de tipo no indiferenciado suelen requerir un nivel mucho menor de interacción TCR/CD3 para activarse y entrar en el ciclo celular. En algunos aspectos, señales más fuertes pueden causar o aumentar los niveles de muerte celular inducida por activación en células de tipo no indiferenciado o en determinadas poblaciones de las mismas.

Por tanto, en algunos casos, cuando la composición incluye una población de linfocitos T de tipo indiferenciado y de tipo no indiferenciado, y se utilizan condiciones que inducen una señal activadora que está por debajo del umbral de activación requerido para la activación de linfocitos T de tipo indiferenciado, principalmente los linfocitos T de tipo no indiferenciado se activarán y serán susceptibles a condiciones estimulantes que pueden conducir a la muerte celular. Por ejemplo, en condiciones estimulantes particulares, la muerte celular puede deberse a muerte celular inducida por activación.

En algunos aspectos, las condiciones estimulantes son tales que se induce la muerte celular inducida por activación en células de tipo indiferenciado en comparación con otras condiciones, tal como las condiciones estándar. Por tanto, la presente divulgación desvela métodos para la eliminación de al menos una porción sustancial de cualquier subpoblación no deseada de linfocitos T, p. ej., linfocitos T de tipo no indiferenciado de la composición de entrada. A los efectos de los métodos desvelados, una parte sustancial significa al menos un 70 % de la subpoblación de células no deseadas, p. ej., linfocitos T de tipo no indiferenciado de la composición de entrada. En determinados casos, una parte sustancial significa un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % y superior de la subpoblación de células no deseadas, p. ej., linfocitos T de tipo no indiferenciado de la composición de entrada. La eliminación de células, tal como por muerte celular de linfocitos T de tipo no indiferenciado, puede medirse utilizando diversas técnicas, incluyendo, pero sin limitación, análisis de citometría de flujo utilizando una variedad de anticuerpos y/o tetrámeros de péptidos-MHC y ensayos funcionales tales como ensayos de proliferación y liberación de cromo.

En algunos casos, se añade una enzima a la composición de entrada para retirar los componentes celulares residuales de la eliminación de células. Por ejemplo, en algunos casos ilustrativos se añade desoxirribonucleasa (ADNasa) o una desoxirribonucleasa I humana recombinante (Pulmozyme®) a la composición de entrada. En algunos aspectos, las condiciones estimulantes incluyen desoxirribonucleasa (ADNasa) o desoxirribonucleasa I humana recombinante (Pulmozyme®).

En algunos casos, las condiciones estimulantes no comprenden componentes de cultivo que se suplementan para conservar subconjuntos particulares de linfocitos T, por ejemplo, linfocitos T de tipo no indiferenciado. Por lo tanto, en algunos casos, la eliminación de componentes del cultivo de las condiciones estimulantes puede contribuir a la eliminación de linfocitos T de tipo no indiferenciado. En algunos aspectos, la condición estimuladora se lleva a cabo, o se lleva a cabo adicionalmente, excluyendo o reduciendo la concentración de reactivos de cultivo que se sabe o que es probable que reduzcan la MCIa y/o que promuevan la supervivencia de células más maduras, tal como de células no indiferenciadas. En algunos casos, la condición estimulante no incluye N-acetil cisteína o incluye N-acetil cisteína en una cantidad o concentración reducida. En algunos casos, la condición estimulante no incluye una IL-7 y/o IL-15 recombinante o incluye una cantidad o concentración reducida de IL-7 o IL-15 recombinante. En algunos casos, podrían incluirse aditivos de cultivo que ayuden o promuevan adicionalmente la eliminación de células no indiferenciadas (p. ej., toxina unida a CD45RO).

En determinados casos, los tiempos de estimulación y/o ampliación pueden estar entre 2 y 15 días, entre 2 y 12 días, entre 2 y 10 días, entre 2 y 8 días, entre 2 y 6 días, entre 2 y 4 días, entre 4 y 12 días, entre 4 y 10 días, entre 4 y 8 días, entre 4 y 6 días, entre 6 y 12 días, entre 6 y 10 días, entre 6 y 8 días, entre 8 y 12 días, entre 8 y 10 días o entre 10 y 12 días. En algunos casos, las células se incuban durante al menos 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días o durante más de 14 días. En un caso del método desvelado, la mezcla puede cultivarse durante 30 minutos a varias horas (aproximadamente 3 horas) a aproximadamente 14 días o cualquier valor entero horario o minuto intermedio. En otro caso, la mezcla puede cultivarse durante 21 días. En un caso, las perlas y los linfocitos T se cultivan conjuntamente durante aproximadamente ocho días. En otro caso, las perlas y los linfocitos T se cultivan conjuntamente durante al menos o al menos aproximadamente 2-3 días. En otro caso, las perlas y los linfocitos T se cultivan conjuntamente durante al menos o al menos aproximadamente 2 días o al menos o al menos aproximadamente 48 horas. En algunos aspectos, también pueden desearse varios ciclos de estimulación de tal manera que el tiempo de cultivo de los linfocitos T puede ser de 60 días o más.

La incubación y/o la genomodificación se pueden llevar a cabo en un recipiente de cultivo, tal como una unidad, cámara, pocillo, columna, tubo, conjunto de tubos, válvula, vial, placa de cultivo, bolsa u otro contenedor para el cultivo o cultivar células. En algunos casos, las composiciones o células se incuban en presencia de condiciones estimulantes o de un agente estimulador. Dichas condiciones incluyen las diseñadas para inducir la proliferación, la ampliación, activación y/o supervivencia de células en la población, para imitar la exposición al antígeno y/o para preparar a las células para la genomodificación, tal como para la introducción de un receptor de antígeno recombinante.

Los métodos desvelados incluyen generalmente la incubación (p. ej., de composiciones de entrada que contienen linfocitos T) en condiciones estimulantes. En el contexto de estimulación de linfocitos T, las condiciones estimulantes generalmente incluyen un agente primario capaz de unirse, ligarse, entrecruzarse y/o inducir la activación a través de un dominio de señalización intracelular de, un complejo TCR o un miembro del mismo, tal como CD3. En algunos casos, las condiciones estimulantes incluyen un agente primario que se une específicamente a un miembro de un complejo TCR y un agente secundario que se une específicamente a una molécula coestimuladora de linfocitos T. En algunos ejemplos específicos, el agente primario se une específicamente a CD3 y/o la molécula coestimuladora se selecciona del grupo que consiste en CD28, CD137(4-1-BB), OX40 o ICOS.

En algunos casos, las condiciones estimulantes incluyen anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 inmovilizados, anticuerpos solubles anti-CD3, derivados de dichos anticuerpos, y/u otros ligandos que interaccionan sobre el complejo TCR/CD3 de los linfocitos T. En algunos aspectos, el agente primario activa o inicia la cascada de señalización intracelular de TCR/CD3 en un linfocito T. Dichos agentes pueden incluir compañeros de unión, tales como ligandos y/o anticuerpos naturales, incluidos fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno, tales como los específicos para un componente de TCR tal como CD3. Son ejemplos de anticuerpos anti-CD3, BC3, OKT3 y G19-4.

En algunos casos, las condiciones estimulantes incluyen además la incubación con un agente secundario, tal como un agente capaz de inducir una señal coestimuladora a un linfocito T, tal como una señal que junto con una señal primaria (p. ej., ligamiento a TCR/CD3), conduce a la proliferación y/o activación de linfocitos T. Son ejemplos de agentes secundarios los que se unen específicamente a una molécula coestimuladora o accesoria de linfocito T, se ligan, reticular y/o inducen acontecimientos de señalización intracelular a través de ella, tal como CD28, CD137(4-1-BB), OX40, ICOS, CD40, LFA-1, DAP10 y/o CD54. Como agentes se incluyen anticuerpos, incluyendo fragmentos de los mismos, ligandos naturales y otros compañeros de unión. En algunos casos, el agente secundario se une a CD28, tal como un anticuerpo anti-CD28, incluidos fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno. En algunos aspectos, es un anticuerpo anti-CD28. Son ejemplos de anticuerpos anti-CD28, B-T3 y XR-CD28.

En algunos casos, el compañero o agente de unión que se une específicamente a una molécula en particular, tal como a una molécula coestimuladora de linfocitos T, incluye anticuerpos específicos para dichas moléculas, incluidos fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno. En algunos aspectos, el anticuerpo, p. ej., anticuerpo anti-CD3 y/o anti-CD28, se incluye a una concentración de al menos, o de aproximadamente, 0,5 ng/ml. En algunos aspectos, los agentes incluyen uno o más compañeros de unión para dicha molécula, tal como un compañero de unión natural. Los agentes también pueden incluir ligandos y complejos naturales, incluyendo moléculas y/o complejos en células presentadoras de antígeno y/o superantígeno (enterotoxina A de *Staphylococcus* (SEA, *Staphylococcus enterotoxin A*), enterotoxina B de *Staphylococcus* (SEB, *Staphylococcus enterotoxin B*), toxina 1 del síndrome de choque térmico (TSST-1, *Toxic Shock Syndrome Toxin 1*), endotoxina). Otros agentes ilustrativos son los que imitan la señalización a través de una molécula de señalización primaria o coestimuladora de linfocitos T, tal como un mitógeno que incluye un activador de la PKC, forbol miristato acetato (PMA), fitohemaglutinina (PHA) y/o ionóforo de calcio, p. ej., ionomicina, lipopolisacárido (LPS), mitógeno de linfocitos T y citocinas. En algunos aspectos, las condiciones incluyen la incubación con uno o más citocinas estimuladoras u otros factores, tales como IL-2 y/o IL-15. En algunos aspectos, la concentración de citocina es de al menos aproximadamente 10 unidades/ml.

Los agentes primarios y secundarios (coestimuladores), en algunos casos están unidos a una superficie sólida o a un soporte, tal como a una partícula, p. ej., una perla. En algunos casos, las células pueden incubarse y/o ponerse en contacto con un agente estimulador capaz de activar y/o ampliar linfocitos T. En algunos aspectos, los agentes primarios y secundarios están acoplados a una superficie sólida, tal como a una partícula, p. ej., a una perla. En determinados casos, el agente estimulador comprende una partícula, p. ej., una perla, que está conjugada o unida a uno o más agentes, p. ej., biomoléculas, que son capaces de activar y/o ampliar células, p. ej., linfocitos T. En algunos casos, el uno o más agentes están unidos a una perla. En algunos casos, la perla es biocompatible, es decir, está compuesta de un material que es adecuado para el uso biológico. En algunos casos, las perlas no son tóxicas para las células cultivadas, p. ej., linfocitos T cultivados. En algunos casos, las perlas pueden ser cualquiera de las partículas capaces de adherir agentes de manera que permitan una interacción entre el agente y una célula.

En algunos casos, un agente estimulador comprende uno o más agentes capaces de activar y/o ampliar células, p. ej., linfocitos T, que están unidos o de otro modo adheridos a una perla, por ejemplo, a la superficie de la perla. En determinados casos, la perla es una partícula no celular. En casos particulares, la perla puede incluir una partícula coloidal, una microesfera, nanopartícula, una perla magnética, o similares. En algunos casos, las perlas son perlas de agarosa. En determinados casos, las perlas son perlas de sefarosa.

En casos particulares, el agente estimulador comprende perlas monodispersas. En determinados casos, las perlas monodispersas comprenden dispersiones de tamaño que tienen una desviación estándar del diámetro inferior al 5 % entre sí.

En algunos casos, la perla contiene uno o más agentes, tal como un agente que está acoplado, conjugado o unido (directa o indirectamente) a la superficie de la perla. En algunos casos, un agente como se contempla en el presente documento puede incluir, pero sin limitación, ARN, ADN, proteínas (p. ej., enzimas), antígenos, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpo, hidratos de carbono, lípidos lectinas, o cualquier otra biomolécula con afinidad por una diana deseada. En algunos casos, la diana deseada es un receptor de linfocitos T y/o un componente de un receptor de linfocitos T. En determinados casos, la diana deseada es CD3. En un caso determinado, la diana deseada es una molécula coestimuladora, p. ej., CD28. Uno o más agentes pueden adherirse directa o indirectamente a la perla mediante diversos métodos. La adhesión puede ser covalente, no covalente, electrostática o hidrófoba, y puede conseguirse mediante diversos medios de adhesión, entre los que se incluyen, por ejemplo, medios químicos, medios mecánicos o medios enzimáticos. En algunos casos, una biomolécula (p. ej., un anticuerpo anti-CD3 biotinilado) puede adherirse indirectamente a una perla a través de otra biomolécula (p. ej., un anticuerpo antibiotina) que esté directamente adherida a la perla.

En algunos casos, uno o más de los agentes adheridos a la perla es un anticuerpo. El anticuerpo puede incluir un anticuerpo policlonal, anticuerpo monoclonal (incluidos anticuerpos de longitud completa que tienen una región Fc de inmunoglobulina), composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica, anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos, diacuerpos y moléculas monocatenarias, así como fragmentos de anticuerpo (p. ej., Fab, F(ab')<sub>2</sub> y Fv). En algunos casos, el reactivo estimulador es un fragmento de anticuerpo (incluyendo un fragmento de unión a antígeno), p. ej., un fragmento Fab, Fab'-SH, Fv, scFv o (Fab')<sub>2</sub>. Se apreciará que, para los anticuerpos contemplados en el presente documento, pueden usarse regiones constantes de cualquier isotipo, incluyendo regiones

constantes de IgG, IgM, IgA, IgD e IgE y que dichas regiones constantes pueden obtenerse de cualquier especie humana o animal (p. ej., de especies murinas). En algunos casos, el agente es un anticuerpo que se une a, y/o reconoce, uno o más componentes de un receptor de linfocitos T. En casos particulares, el agente es un anticuerpo anti-CD3. En determinados casos, el agente es un anticuerpo que se une a, y/o reconoce, un correceptor. En algunos casos, el reactivo estimulador comprende un anticuerpo anti-CD28.

En algunos casos, la perla tiene un diámetro superior a aproximadamente 0,001  $\mu\text{m}$ , superior a aproximadamente 0,01  $\mu\text{m}$ , superior a aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}$ , superior a aproximadamente 1,0  $\mu\text{m}$ , superior a aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , superior a aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ , superior a aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  o superior a aproximadamente 1000  $\mu\text{m}$  y no superior a aproximadamente 1500  $\mu\text{m}$ . En algunos casos, la perla tiene un diámetro de aproximadamente 1,0  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 500  $\mu\text{m}$ , de aproximadamente 1,0  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 150  $\mu\text{m}$ , de aproximadamente 1,0  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 30  $\mu\text{m}$ , de aproximadamente 1,0  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , de aproximadamente 1,0  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 5,0  $\mu\text{m}$ , de aproximadamente 2,0  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 5,0  $\mu\text{m}$  o de aproximadamente 3,0  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 5,0  $\mu\text{m}$ . En algunos casos, la perla tiene un diámetro de aproximadamente 3  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ . En algunos casos, la perla tiene un diámetro de al menos o de al menos aproximadamente o de aproximadamente 0,001  $\mu\text{m}$ , 0,01  $\mu\text{m}$ , 0,1  $\mu\text{m}$ , 0,5  $\mu\text{m}$ , 1,0  $\mu\text{m}$ , 1,5  $\mu\text{m}$ , 2,0  $\mu\text{m}$ , 2,5  $\mu\text{m}$ , 3,0  $\mu\text{m}$ , 3,5  $\mu\text{m}$ , 4,0  $\mu\text{m}$ , 4,5  $\mu\text{m}$ , 5,0  $\mu\text{m}$ , 5,5  $\mu\text{m}$ , 6,0  $\mu\text{m}$ , 6,5  $\mu\text{m}$ , 7,0  $\mu\text{m}$ , 7,5  $\mu\text{m}$ , 8,0  $\mu\text{m}$ , 8,5  $\mu\text{m}$ , 9,0  $\mu\text{m}$ , 9,5  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$ , 12  $\mu\text{m}$ , 14  $\mu\text{m}$ , 16  $\mu\text{m}$ , 18  $\mu\text{m}$  o 20  $\mu\text{m}$ . En determinados casos, la perla tiene un diámetro de o de aproximadamente 4,5  $\mu\text{m}$ . En determinados casos, la perla tiene un diámetro de o de aproximadamente 2,8  $\mu\text{m}$ .

En algunos casos, las perlas tienen una densidad superior a 0,001  $\text{g/cm}^3$ , superior a 0,01  $\text{g/cm}^3$ , superior a 0,05  $\text{g/cm}^3$ , superior a 0,1  $\text{g/cm}^3$ , superior a 0,5  $\text{g/cm}^3$ , superior a 0,6  $\text{g/cm}^3$ , superior a 0,7  $\text{g/cm}^3$ , superior a 0,8  $\text{g/cm}^3$ , superior a 0,9  $\text{g/cm}^3$ , superior a 1  $\text{g/cm}^3$ , superior a 1,1  $\text{g/cm}^3$ , superior a 1,2  $\text{g/cm}^3$ , superior a 1,3  $\text{g/cm}^3$ , superior a 1,4  $\text{g/cm}^3$ , superior a 1,5  $\text{g/cm}^3$ , superior a 2  $\text{g/cm}^3$ , superior a 3  $\text{g/cm}^3$ , superior a 4  $\text{g/cm}^3$  o superior a 5  $\text{g/cm}^3$ . En algunos casos, las perlas tienen una densidad de entre aproximadamente 0,001  $\text{g/cm}^3$  y aproximadamente 100  $\text{g/cm}^3$ , de aproximadamente 0,01  $\text{g/cm}^3$  y aproximadamente 50  $\text{g/cm}^3$ , de aproximadamente 0,1  $\text{g/cm}^3$  y aproximadamente 10  $\text{g/cm}^3$ , de aproximadamente 0,1  $\text{g/cm}^3$  y aproximadamente 0,5  $\text{g/cm}^3$ , de aproximadamente 0,5  $\text{g/cm}^3$  y aproximadamente 1  $\text{g/cm}^3$ , de aproximadamente 0,5  $\text{g/cm}^3$  y aproximadamente 1,5  $\text{g/cm}^3$ , de aproximadamente 1  $\text{g/cm}^3$  y aproximadamente 1,5  $\text{g/cm}^3$ , de aproximadamente 1  $\text{g/cm}^3$  y aproximadamente 2  $\text{g/cm}^3$ , o de aproximadamente 1  $\text{g/cm}^3$  y aproximadamente 5  $\text{g/cm}^3$ . En algunos casos, las perlas tienen una densidad de aproximadamente 0,5  $\text{g/cm}^3$ , aproximadamente 0,6  $\text{g/cm}^3$ , aproximadamente 0,7  $\text{g/cm}^3$ , aproximadamente 0,8  $\text{g/cm}^3$ , aproximadamente 0,9  $\text{g/cm}^3$ , aproximadamente 1,0  $\text{g/cm}^3$ , aproximadamente 1,1  $\text{g/cm}^3$ , aproximadamente 1,2  $\text{g/cm}^3$ , aproximadamente 1,3  $\text{g/cm}^3$ , aproximadamente 1,4  $\text{g/cm}^3$ , aproximadamente 1,5  $\text{g/cm}^3$ , aproximadamente 1,6  $\text{g/cm}^3$ , aproximadamente 1,7  $\text{g/cm}^3$ , aproximadamente 1,8  $\text{g/cm}^3$ , aproximadamente 1,9  $\text{g/cm}^3$  o aproximadamente 2,0  $\text{g/cm}^3$ . En determinados casos, las perlas tienen una densidad de aproximadamente 1,6  $\text{g/cm}^3$ . En casos particulares, las perlas o partículas tienen una densidad de aproximadamente 1,5  $\text{g/cm}^3$ . En determinados casos, las partículas tienen una densidad de aproximadamente 1,3  $\text{g/cm}^3$ .

En determinados casos, una pluralidad de las perlas tiene una densidad uniforme. En determinados casos, una densidad uniforme comprende una desviación estándar de la densidad inferior al 10 %, inferior al 5 % o inferior al 1 % de la densidad media de la perla.

En algunos casos, las perlas tienen una superficie de entre aproximadamente 0,001  $\text{m}^2$  por cada gramo de partículas ( $\text{m}^2/\text{g}$ ) a aproximadamente 1.000  $\text{m}^2/\text{g}$ , de aproximadamente 0,010  $\text{m}^2/\text{g}$  a aproximadamente 100  $\text{m}^2/\text{g}$ , de aproximadamente 0,1  $\text{m}^2/\text{g}$  a aproximadamente 10  $\text{m}^2/\text{g}$ , de aproximadamente 0,1  $\text{m}^2/\text{g}$  a aproximadamente 1  $\text{m}^2/\text{g}$ , de aproximadamente 1  $\text{m}^2/\text{g}$  a aproximadamente 10  $\text{m}^2/\text{g}$ , de aproximadamente 10  $\text{m}^2/\text{g}$  a aproximadamente 100  $\text{m}^2/\text{g}$ , de aproximadamente 0,5  $\text{m}^2/\text{g}$  a aproximadamente 20  $\text{m}^2/\text{g}$ , de aproximadamente 0,5  $\text{m}^2/\text{g}$  a aproximadamente 5  $\text{m}^2/\text{g}$ , o de aproximadamente 1  $\text{m}^2/\text{g}$  a aproximadamente 4  $\text{m}^2/\text{g}$ . En algunos casos, las partículas o perlas tienen una superficie de aproximadamente 1  $\text{m}^2/\text{g}$  a aproximadamente 4  $\text{m}^2/\text{g}$ .

En algunos casos, la perla contiene al menos un material en la superficie, o cerca de ésta, que puede acoplarse, ligarse o conjugarse, con un agente. En algunos casos, la perla está funcionalizado en la superficie, es decir, comprende grupos funcionales capaces de formar un enlace covalente con una molécula de unión, p. ej., un polinucleótido o un polipéptido. En casos particulares, la perla comprende grupos carboxilo, amino, hidroxilo, tosilo, epoxi y/o clorometilo, expuestos en la superficie. En casos particulares, las perlas comprenden agarosa y/o sefarosa expuesta en la superficie. En determinados casos, la superficie de la perla comprende reactivos estimuladores adheridos que pueden unirse o adherirse a moléculas de unión. En casos particulares, las biomoléculas son polipéptidos. En algunos casos, las perlas comprenden proteína A, proteína G o biotina, expuesta en la superficie.

En algunos casos, la perla reacciona en un campo magnético. En algunos casos, la perla es una perla magnética. En algunos casos, la perla magnética es paramagnética. En casos particulares, la perla magnética es superparamagnética. En determinados casos, las perlas no muestran ninguna propiedad magnética a menos que se expongan a un campo magnético.

En casos particulares, la perla comprende un núcleo magnético, un núcleo paramagnético o un núcleo superparamagnético. En algunos casos, el núcleo magnético contiene un metal. En algunos casos, el metal puede

- ser, pero sin limitación, hierro, níquel, cobre, cobalto, gadolinio, manganeso, tántalo, cinc, circonio o cualquier combinación de los mismos. En determinados casos, el núcleo magnético comprende óxidos metálicos (p. ej., óxidos de hierro), ferritas (p. ej., ferritas de manganeso, ferritas de cobalto, ferritas de níquel, etc.), hematita y aleaciones metálicas (p. ej., CoTaZn). En algunos casos, el núcleo magnético comprende uno o más de una ferrita, un metal, una aleación metálica, un óxido de hierro o dióxido de cromo. En algunos casos, el núcleo magnético comprende hierro elemental o un compuesto del mismo. En algunos casos, el núcleo magnético comprende uno o más de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), maghemita ( $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) o greigita ( $\text{Fe}_3\text{S}_4$ ). En algunos casos, el núcleo interno comprende un óxido de hierro (p. ej.,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ).
- 10 En determinados casos, la perla contiene un núcleo magnético, paramagnético y/o superparamagnético que está cubierto por una capa o revestimiento funcionalizado en la superficie. En algunos casos, la capa puede contener un material que puede incluir, pero sin limitación, un polímero, un polisacárido, una sílice, un ácido graso, una proteína, un carbón, agarosa, sefarosa, o combinaciones de los mismos. En algunos casos, el polímero puede ser un polietilenglicol, poli(ácido láctico-co-glicólico), poliglutaraldehído, poliuretano, poliestireno, o un alcohol polivinílico. En determinados casos, la capa o revestimiento exterior comprende poliestireno. En casos particulares, el revestimiento exterior está funcionalizado en superficie.
- 20 En algunos casos, el reactivo estimulador comprende una perla que contiene un núcleo de óxido metálico (p. ej., un núcleo de óxido de hierro) y una capa, en donde el núcleo de óxido metálico comprende al menos un polisacárido (p. ej., dextrano), y en donde la capa comprende al menos un polisacárido (p. ej., amino dextrano), al menos un polímero (p. ej., poliuretano) y sílice. En algunos casos, el núcleo de óxido metálico es un núcleo de óxido de hierro coloidal. En determinados casos, el uno o más agentes incluyen un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En casos particulares, el uno o más agentes incluyen un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28. En algunos casos, el reactivo estimulador comprende un anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD28, y un anticuerpo antibiotina.
- 25 En algunos casos, el reactivo estimulador comprende un anticuerpo antibiotina. En algunos casos, la perla tiene un diámetro de aproximadamente  $3\text{ }\mu\text{m}$  a aproximadamente  $10\text{ }\mu\text{m}$ . En algunos casos, la perla tiene un diámetro de aproximadamente  $3\text{ }\mu\text{m}$  a aproximadamente  $5\text{ }\mu\text{m}$ . En determinados casos, la perla tiene un diámetro de aproximadamente  $3,5\text{ }\mu\text{m}$ .
- 30 En algunos casos, el reactivo estimulador comprende uno o más agentes que están adheridos a una perla que comprende un núcleo de óxido metálico (p. ej., un núcleo interno de óxido de hierro) y una capa (p. ej., una capa protectora), en donde la capa comprende poliestireno. En determinados casos, las perlas son perlas superparamagnéticas, monodispersas, que comprenden un núcleo de hierro superparamagnético, p. ej., un núcleo que comprende magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) y/o maghemita ( $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) y una capa o revestimiento de poliestireno. En algunos casos, la perla no es porosa. En algunos casos, las perlas contienen una superficie funcionalizada a la que se adhieren uno o más agentes. En determinados casos, el uno o más agentes se unen de manera covalente a las perlas en la superficie. En algunos casos, el uno o más agentes incluyen un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos casos, el uno o más agentes incluyen un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28. En determinados casos, las perlas tienen una densidad de aproximadamente  $1,5\text{ g/cm}^3$  y una superficie de aproximadamente  $1\text{ m}^2/\text{g}$  a aproximadamente  $4\text{ m}^2/\text{g}$ . En casos particulares; las perlas son perlas superparamagnéticas monodispersas que tienen un diámetro de aproximadamente  $4,5\text{ }\mu\text{m}$  y una densidad de aproximadamente  $1,5\text{ g/cm}^3$ . En algunos casos, las perlas son perlas superparamagnéticas monodispersas que tienen un diámetro medio de aproximadamente  $2,8\text{ }\mu\text{m}$  y una densidad de aproximadamente  $1,3\text{ g/cm}^3$ .
- 45 Para efectuar el aislamiento de diferentes poblaciones de linfocitos T, los tiempos de exposición a las partículas pueden variar. Por ejemplo, en un caso preferido, los linfocitos T se aíslan mediante incubación con perlas  $3\times 28$ , tal como DYNABEADS® M-450, o Dynabeads® CD3/CD28 CTS™, durante un periodo de tiempo suficiente para la selección positiva de los linfocitos T deseados. En un caso, el periodo de tiempo es de aproximadamente 30 minutos. En un caso adicional, el periodo de tiempo es de al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 horas. Incluso en otro caso preferido, el periodo de tiempo es de 10 a 24 horas o más. En un caso preferido, el periodo de tiempo de incubación es de 24 horas. Para el aislamiento de linfocitos T de pacientes con cáncer, el uso de tiempos de incubación más largos, tal como de 24 horas, puede aumentar el rendimiento celular.
- 50 Cuando se acoplan a una superficie, los agentes pueden acoplarse a la misma superficie (es decir, en formación "cis") o a superficies distintas (es decir, en formación "trans"). De manera alternativa, un agente puede acoplarse a una superficie y el otro agente estar en solución. En un caso, el agente que proporciona la señal coestimuladora está unido a una superficie celular y el agente que proporciona la señal de activación primaria está en solución o acoplado a una superficie. En un caso preferido, los dos agentes se inmovilizan en perlas, en la misma perla, es decir, en "cis", o en perlas distintas, es decir, en "trans". Como ejemplo, el agente que proporciona la señal de activación primaria es un anticuerpo anti-CD3 y el agente que proporciona la señal coestimuladora es un anticuerpo anti-CD28; y ambos agentes se inmovilizan conjuntamente en la misma perla en cantidades moleculares equivalentes. En un caso, se utiliza una proporción de 1:1 de cada anticuerpo unido a las perlas para la ampliación de linfocitos T  $\text{CD4}^+$  y el crecimiento de linfocitos T. En determinados aspectos de la presente divulgación, se utiliza una proporción de anticuerpos anti CD3:CD28 unidos a las perlas de tal manera que se observa un aumento de la ampliación de linfocitos T en comparación con la ampliación observada utilizando una proporción de 1:1. En un caso particular se observa un aumento de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 3 veces en comparación con la ampliación utilizando una
- 55
- 60
- 65

- proporción de 1:1. En un caso, la proporción de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas varía entre 100:1 y 1:100 y todos los valores enteros entre ellos. En un aspecto de la presente divulgación, a las partículas se unen más anticuerpo anti-CD28 que anticuerpo anti-CD3, es decir, la proporción de CD3:CD28 es inferior a uno. En determinados casos de la divulgación, la proporción entre el anticuerpo anti CD28 y el anticuerpo anti CD3 unido a las perlas es superior a 2: 1. En un caso particular, se utiliza una proporción de anticuerpo CD3:CD28 de 1:200 unido a las perlas. En un caso particular, se utiliza una proporción de anticuerpo CD3:CD28 de 1:150 unido a las perlas. En un caso particular, se utiliza una proporción de anticuerpo CD3:CD28 de 1:100 unido a las perlas. En otro caso, se utiliza una proporción de anticuerpo CD3:CD28 de 1:75 unido a las perlas. En un caso adicional, se utiliza una proporción de anticuerpo CD3:CD28 de 1:50 unido a las perlas. En otro caso, se utiliza una proporción de anticuerpo CD3:CD28 de 1:45 unido a las perlas. En otro caso, se utiliza una proporción de anticuerpo CD3:CD28 de 1:40 unido a las perlas. En otro caso, se utiliza una proporción de anticuerpo CD3:CD28 de 1:35 unido a las perlas. En otro caso, se utiliza una proporción de anticuerpo CD3:CD28 de 1:30 unido a las perlas. En otro caso, se utiliza una proporción de anticuerpo CD3:CD28 de 1:25 unido a las perlas. En otro caso, se utiliza una proporción de anticuerpo CD3:CD28 de 1:20 unido a las perlas. En otro caso, se utiliza una proporción de anticuerpo CD3:CD28 de 1:15 unido a las perlas. En un caso, se utiliza una proporción de anticuerpo CD3:CD28 de 1:10 unido a las perlas. En otro caso, se utiliza una proporción de anticuerpo CD3:CD28 de 1:5 unido a las perlas. En otro caso, se utiliza una proporción de anticuerpo CD3:CD28 de 1:4 unido a las perlas. En otro caso, se utiliza una proporción de anticuerpo CD3:CD28 de 1:3 unido a las perlas. En otro caso más, se utiliza una proporción de anticuerpo CD3:CD28 de 3:1 unido a las perlas.
- En algunos casos, el agente, p. ej., anticuerpo, se añade en forma soluble al cultivo o a la composición. En algunos casos, un agente se incluye en forma soluble y otro agente se incluye acoplado al soporte sólido. En algunos aspectos, cuando dos o más agentes están acoplados al soporte o soportes sólidos, dos agentes se acoplan al mismo soporte o partícula, p. ej., mediante incubación con perlas anti-CD3/anti-CD28, conteniendo las perlas anticuerpos que reconocen CD3 y CD28. En otros aspectos, los dos o más agentes están acoplados a distintos soportes, tal como a distintas perlas. Por ejemplo, en algunos aspectos, al cultivo se añaden perlas anti-CD3 y anti-CD28 por separado.
- En algunos casos, las condiciones de cultivo incluyen células presentadoras de antígeno artificiales. Por ejemplo, la superficie en algunos aspectos es una célula presentadora de antígeno artificial cargada con un agente o agentes capaces de potenciar una señal a través de un complejo TCR, tal como anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28. Son células presentadoras de antígeno ilustrativas las células genomodificadas, tales como células mieloides (p. ej., K562 o U937) genomodificadas para expresar receptores de Fc, tales como los receptores de Fc de afinidad intermedia por CD32 o de alta afinidad por CD64. Dichas células pueden cargarse con anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28 reconocidos por los receptores de Fc e incubarse con los linfocitos T para emitir la señal en el cultivo. Se describen APC artificiales ilustrativas y proporciones y métodos de uso de las mismas en condiciones de cultivo, en Suhoski *et al.*, *Molecular Therapy* (2007) 15 5, 981-988; Thomas *et al.*, *Clin Immunol* (2002) 105(3): 259-72; Kim *et al.*, *Nature Biotechnology* 22, 403 - 410 (2004). En algunos casos, las condiciones de cultivo incluyen células presentadoras de antígeno, tales como las CMSP, cargadas con antígeno, tal como el antígeno reconocido por el complejo TCR u otro receptor en las células a transducir, tales como linfocitos T específicos para un antígeno tumoral en particular.
- En algunos casos, la ampliación o proliferación preferente de linfocitos T de tipo indiferenciado frente a los de tipo no indiferenciado se consigue utilizando condiciones estimuladoras diseñadas para inducir una intensidad de señal particular, tal como una intensidad de señal estimuladora o activadora superior a un determinado nivel, p. ej., para inducir la muerte celular de linfocitos T de tipo no indiferenciado. En algunos aspectos, una señal más fuerte induce la muerte celular de los linfocitos T de tipo no indiferenciado de la composición de entrada, mientras que una señal más débil, no induce la muerte celular de los linfocitos T de tipo no indiferenciado de la composición de entrada y/o conserva la supervivencia de los linfocitos T de tipo no indiferenciado, en comparación con una señal más fuerte. Por tanto, en algunos casos, una señal más fuerte activa o causa preferentemente la muerte celular de los linfocitos T de tipo no indiferenciado.
- En algunos aspectos, la ampliación o proliferación preferente de linfocitos T de tipo indiferenciado frente a los de tipo no indiferenciado, se consigue mediante una proporción particular de perlas y células. En algunos casos, puede emplearse cualquier condición estimuladora que favorezca la ampliación o la supervivencia de los linfocitos T de tipo indiferenciado sobre la de los linfocitos T de tipo no indiferenciado. En algunos casos, las condiciones de estimulación incluyen la incubación en presencia de un reactivo de perla que contenga una señal primaria y/o secundaria para la activación de linfocitos T, p. ej., un reactivo de perla anti-CD3/anti-CD28, tal como se proporciona, en una cantidad que favorezca la proliferación y/o supervivencia de linfocitos de tipo indiferenciado y/o que induzca preferentemente la muerte celular inducida por activación (MCIA) de linfocitos de tipo no indiferenciado. En algunos casos, dichos reactivos de perla se incuban con células a una proporción de perlas y células de 1:1 o superior, que, en algunos aspectos, pueden conducir hacia más MCIA y aumentar el porcentaje de supervivencia de linfocitos de tipo indiferenciado, Véase, p. ej., Kalamasz *et al.*, *J Immunother.* (2004) 27(5):405-418 y la patentes de EE. UU. N.º: 7.977.095 y 9.528.088. En un caso, la proporción es de aproximadamente 50:1 a aproximadamente 5:1. En determinados casos, la proporción es de aproximadamente 100:1 a aproximadamente 1:1. En un ejemplo, la proporción es de al menos aproximadamente 45:1. En determinados casos, la proporción es de al menos aproximadamente 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 o 1:1. En algunos aspectos, se utiliza una proporción entre perla y célula inferior a 5:1 o inferior a 3:1. En un caso particular, la proporción es de aproximadamente 3:1.



En un caso de los métodos desvelados, las proporciones entre perla:célula pueden adaptarse para obtener un fenotipo de linfocito T deseado. En un caso particular, las proporciones entre perla:célula pueden variar para ampliar o eliminar selectivamente subconjuntos de linfocitos T. En un caso, la relación particular entre perla:célula utilizada induce selectivamente la muerte celular de linfocitos T de tipo no indiferenciado o de células procedentes de linfocitos T no indiferenciado de la composición de entrada. En un caso adicional, la relación particular entre perla:célula utilizada amplia selectivamente linfocitos T de tipo indiferenciado o células procedentes de linfocitos T de tipo indiferenciado. En algunos casos, puede utilizarse una proporción determinada siempre que se produzca la ampliación o eliminación deseada de subconjuntos de linfocitos T. Por lo tanto, las composiciones y métodos descritos en el presente documento pueden usarse para ampliar poblaciones específicas de linfocitos T, o para eliminar poblaciones específicas de linfocitos T, para su uso en cualquier diversidad de entornos inmunoterápicos descritos en el presente documento.

También se desvelan condiciones estimulantes apropiadas para el método de incubación (p. ej., estimulación) de linfocitos T. Las condiciones apropiadas para el cultivo de linfocitos T incluyen un medio apropiado (p. ej., OpTmizer™ (Gibco), medio esencial mínimo o medio RPMI 1640 o, X-vivo 15, (BioWhittaker)) que puede contener factores necesarios para la proliferación y la viabilidad, incluyendo suero (por ejemplo, suero fetal bovino o humano), productos de sustitución de suero, o interleucina-2 (IL-2), insulina o cualquier otro aditivo para el crecimiento de las células. Los medios pueden incluir RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM,  $\alpha$ -MEM, F-12, X-Vivo 15 y X-Vivo 20, con aminoácidos y vitaminas añadidos, sin suero o complementados con una cantidad apropiada de suero (o plasma) o sustitución de suero o un conjunto definido de hormonas, y/o una cantidad de citocina(s) suficiente para el crecimiento y la ampliación de linfocitos T. Los antibióticos, p. ej., penicilina y estreptomina, se incluyen solo en cultivos experimentales, no en cultivos de células que se infunden en un sujeto. Las células diana se mantienen en condiciones necesarias para favorecer el crecimiento, por ejemplo, una temperatura (p. ej., de 37 °C) y atmósfera (p. ej., aire y CO<sub>2</sub> al 5 %) adecuadas.

En otro caso, el tiempo de exposición a agentes estimuladores tales como perlas recubiertas con anti-CD3/anti-CD28 (es decir, 3 × 28) puede modificarse o adaptarse de tal manera que se obtenga un fenotipo de linfocitos T deseado. Se puede desear una mayor población de linfocitos T auxiliares (TH, *helper* T), normalmente CD4+ en lugar de linfocitos T citotóxicos o reguladores CD8+, porque una ampliación de linfocitos TH podría mejorar o restaurar la capacidad de respuesta inmunitaria general. Aunque muchas respuestas inmunitarias específicas están mediadas por linfocitos T específicos de antígeno CD8+, que pueden causar directamente la lisis de células diana o destruirlas, la mayoría de las respuestas inmunitarias requieren la ayuda de linfocitos T CD4+, que expresan importantes moléculas inmunorreguladoras, tales como GM-CSF, CD40L e IL-2, por ejemplo. Cuando se prefiere la ayuda mediada por CD4, un método, tal como el que se describe en el presente documento, que preserve o mejore la proporción CD4:CD8, podría ser muy beneficioso. El aumento del número de linfocitos T CD4+ puede aumentar la cantidad de CD40L expresada por las células introducidas en los pacientes, mejorando posiblemente la visibilidad de las células diana (mejora de la función de las APC). Pueden observarse efectos similares al aumentar el número de células infundidas que expresan GM-CSF o IL-2, todas ellas expresadas predominantemente por linfocitos T CD4+. Asimismo, en determinadas aplicaciones, puede ser deseable utilizar una población de linfocitos T reguladores (p. ej., Autoimmun Rev. Agosto de 2002; 1(4): 190-7; Curr Opin Immunol. Diciembre de 2002; 14(6):771-8) que pueda generarse y ampliarse utilizando los métodos descritos en el presente documento. De manera alternativa, en situaciones en las que la ayuda de los CD4 es menos necesaria y se desea aumentar el número de linfocitos T CD8+, también pueden utilizarse los enfoques XCELLERATE™ descritos en el presente documento, mediante, por ejemplo, preselección de linfocitos CD8+ antes de la estimulación y/o cultivo. Pueden darse situaciones de este tipo en las que se prefiera aumentar los niveles de IFN- $\gamma$  o aumentar la citólisis de una célula diana. También se puede modificar el tiempo y el tipo de exposición a los agentes estimuladores para ampliar linfocitos T con un repertorio de TCR deseado, p. ej., expresar genes deseados de la familia V $\beta$ .

Otras condiciones de las condiciones estimulantes, en algunos casos, incluyen también uno o más medios particulares, temperatura, contenido de oxígeno, contenido de dióxido de carbono, tiempo, agentes, p. ej., nutrientes, aminoácidos, antibióticos, iones y/o factores estimuladores, tales como citocinas, quimiocinas, antígenos, compañeros de unión, proteínas de fusión, receptores solubles recombinantes y cualquier otro agente diseñado para activar las células.

En algunos casos, las células o las composiciones se evalúan y/o ajustan durante las etapas de incubación. Por ejemplo, la evaluación y/o el ajuste podrán realizarse en cualquier momento posterior al inicio de la incubación o del cultivo, tal como en un momento durante la incubación. La evaluación puede incluir la toma de una o más mediciones de una composición o recipiente que contenga las células, tal como la evaluación de las células en cuanto a velocidad de proliferación, grado de supervivencia, fenotipo, p. ej., expresión de uno o más marcadores de superficie o intracelulares, tales como proteínas o polinucleótidos, y/o evaluación de la composición o recipiente en cuanto a temperatura, uno o más componentes del medio, contenido de oxígeno o dióxido de carbono, y/o presencia o ausencia o cantidad o cantidad relativa de uno o más factores, agentes, componentes y/o tipos celulares, incluyendo subtipos. La evaluación también puede incluir la evaluación de un indicador o factor pronóstico de un resultado tóxico, tal como usando una evaluación *in vitro* o *ex vivo* como se describe en el presente documento.

En algunos aspectos, la evaluación se realiza de forma automatizada, por ejemplo, usando un dispositivo como se

describe en el presente documento y/o se programa de antemano para realizarse en determinados puntos temporales durante la incubación. En algunos aspectos, el resultado de la evaluación indica que debe realizarse un ajuste.

El ajuste puede incluir el ajuste de cualquier factor o parámetro del cultivo celular, tal como la temperatura, la duración (tiempo) en la que se realizará la incubación o una etapa de la misma (duración de la incubación), la reposición, adición y/o eliminación de uno o más componentes de la composición que se está incubando, p. ej., medio o tampón o componentes de los mismos, agentes, p. ej., nutrientes, aminoácidos, antibióticos, iones y/o factores estimuladores, tales como citocinas, quimiocinas, antígenos, compañeros de unión, proteínas de fusión, receptores solubles recombinantes, o células o tipos celulares o poblaciones de células. En algunos aspectos, la eliminación o adición de diversos componentes u otros ajustes se realiza de forma automatizada, por ejemplo, usando un dispositivo o sistema como se describe en el presente documento. En algunos casos, el sistema se programa de manera que se inicia automáticamente un ajuste basado en una determinada lectura de una evaluación provisional. Por ejemplo, en algunos casos, un sistema o dispositivo se programa para realizar una o más evaluaciones en un momento particular; en dichos casos, el sistema o dispositivo puede programarse además de manera que se obtenga un resultado particular de una evaluación de este tipo, tal como una relación particular de un tipo de célula con respecto a otro, inicie un ajuste particular, tal como la adición de uno o más de los tipos celulares.

En algunos aspectos, el ajuste se realiza mediante adición o eliminación de manera que no altere un entorno cerrado que contiene las células y composiciones, tal como mediante válvulas de entrada y/o extracción, diseñadas para añadir o extraer componentes manteniendo la esterilidad, tal como en uno o más dispositivos o sistemas como se han descrito en el presente documento. Se desvelan diversos ajustes de las condiciones estimulantes para favorecer respuestas y/o los resultados en tipos celulares particulares, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. N.º 8.617.884, y en la solicitud de patente de EE.UU. N.º de publicación: US 20030235908 A1.

En algunos casos, las células se incuban durante o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días, o durante o aproximadamente 1, 2, 3, 4 o más semanas, ya sea en total o antes de la genomodificación. En algunos ejemplos, la incubación se lleva a cabo durante más de, o aproximadamente, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 días.

En algunos aspectos, la incubación se realiza de acuerdo con técnicas tales como las descritas 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/o Wang *et al.* (2012) J Immunother. 35(9):689-701.

En algunos casos, las condiciones estimuladoras incluyen la adición de células alimentadoras, tales como células mononucleares de sangre periférica (CMSP) que no se dividen, (p. ej., de manera que la población de células resultante contenga al menos aproximadamente 5, 10, 20 o 40 o más células CMSP alimentadoras por cada linfocito T en la población inicial que se va a ampliar); e incubar el cultivo (por ejemplo, durante un tiempo suficiente para ampliar el número de linfocitos T). En algunos aspectos, las células alimentadoras que no se dividen pueden comprender células CMSP alimentadoras irradiadas con rayos gamma. En algunos casos, las CMSP se irradian con rayos gamma en el intervalo de aproximadamente 3000 a 3600 rads para impedir la división celular. En algunos aspectos, las células alimentadoras se añaden al medio de cultivo antes de la adición de las poblaciones de linfocitos T.

En algunos casos, las condiciones estimulantes incluyen una temperatura adecuada para el crecimiento de linfocitos T humanos, por ejemplo, de al menos aproximadamente 25 grados centígrados, generalmente de al menos aproximadamente 30 grados, y generalmente a, o aproximadamente a, 37 grados centígrados. Opcionalmente, la incubación puede comprender además, como células alimentadoras, la adición de células linfoblastoides (LCL) transformadas con EBV que no se dividen. Las LCL se pueden irradiar con rayos gamma en el intervalo de aproximadamente 6000 a 10.000 rads. En algunos aspectos, las células LCL alimentadoras se proporcionan en cualquier cantidad adecuada, tal como a una proporción de células LCL alimentadoras y linfocitos T iniciales de al menos aproximadamente 10:1.

En unos casos, los linfocitos T específicos de antígeno, tales como linfocitos T CD4+ y/o CD8+ específicos de antígeno, se obtienen estimulando con antígeno linfocitos T indiferenciados o específicos de antígeno. Por ejemplo, se pueden generar estirpes o clones de linfocitos T específicos de antígeno para antígenos de citomegalovirus aislando linfocitos T de sujetos infectados y estimulando las células *in vitro* con el mismo antígeno.

La incubación y/o genomodificación se pueden llevar a cabo en un recipiente de cultivo, tal como una unidad, cámara, pocillo, columna, tubo, conjunto de tubos, válvula, vial, placa de cultivo, bolsa u otro contenedor para el cultivo o cultivar células.

También se desvelan composiciones iniciadoras de cultivo utilizadas en el método, tales como las que contienen los linfocitos T, p. ej., linfocitos T primarios humanos, condiciones estimulantes, p. ej., los distintos agentes a las concentraciones/proporciones diseñadas para la activación o ampliación preferente de linfocitos T no indiferenciados.

En algunos casos, cuando las células se genomodifican, p. ej., para introducir un receptor de antígeno genomodificado,

la incubación en presencia de uno o más agentes estimuladores continúa durante la fase de genomodificación.

Para estimular los linfocitos T u otras células diana, pueden utilizarse proporciones de perlas y células de 1:500 a 500:1 y cualquier valor entero intermedio. En algunos casos, la proporción entre partículas y células puede depender del tamaño de partícula en relación con la célula diana. Por ejemplo, perlas de pequeño tamaño sólo podrán unirse a algunas células, mientras que perlas más grandes podrán unirse a muchas células. En determinados casos, la proporción entre células y partículas varía entre 1:100 y 100:1 y cualquier valor entero entre ambos y, en otros casos, la proporción comprende entre 1:50 y 50:1 y cualquier valor entero entre ambos. En otro caso, la proporción entre células y partículas que varía entre 1:9 y 9:1 y cualquier valor entero entre ambos, también puede utilizarse para estimular los linfocitos T. La proporción de partículas acopladas a anti-CD3 y anti-CD28 con respecto a los linfocitos T que da lugar a la estimulación de linfocitos T, puede variar como se describe en el presente documento, sin embargo, determinados valores preferidos incluyen al menos 1:150, 1:125, 1:100, 1:75, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2,5, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1 y 15:1, prefiriéndose una proporción de al menos 1:1 perlas por linfocito T. En un caso particular, la proporción preferida entre perlas y células es de 3:1. En algunos casos, la proporción entre perlas y células es de 1:3.

En otros casos, la proporción entre partículas y células puede variar en función del día de estimulación. Por ejemplo, en un caso, la proporción entre partículas y células es de 1:1 a 10:1 el primer día y, a partir de entonces, se añaden partículas adicionales a las células cada día o cada dos días durante un máximo de 10 días, en proporciones finales de 1:1 a 1:10 (según los recuentos celulares del día de la adición). En otro caso, la proporción entre partículas y células es de al menos aproximadamente 1:2,5 el primer día y se añaden partículas adicionales a las células el día 5 a una proporción de aproximadamente 1:10, 1:25, 1:50 o 1:100, el día 7 a 1:10, 1:25, 1:50 o 1:100 y el día 9 a 1:10, 1:25, 1:50 o 1:100. En un caso particular, la proporción entre partículas y células es de 1:1 el primer día de estimulación y se ajusta a 1:5 el tercer y quinto día de estimulación. En otro caso, las partículas se añaden diariamente o cada dos días hasta alcanzar una proporción final de 1:1 el primer día, y de 1:5 el tercer y quinto días de estimulación. En otro caso, la proporción entre partículas y células es de 2:1 el primer día de estimulación y se ajusta a 1:10 el tercer y quinto día de estimulación. En otro caso, las partículas se añaden diariamente o cada dos días hasta alcanzar una proporción final de 1:1 el primer día, y de 1:10 el tercer y quinto días de estimulación. En algunos aspectos, para su uso en la presente divulgación, puede ser adecuada una variedad de distintas proporciones. En particular, las proporciones variarán dependiendo del tamaño de las partículas y del tamaño y tipo de las células.

Un aspecto de la presente divulgación se refiere a la observación de que el uso de diferentes proporciones entre perla (p. ej. reactivo de perla anti-CD3/anti-CD28) y célula, pueden conducir a diferentes resultados con respecto a la ampliación de linfocitos T específicos de antígeno. En particular, las proporciones entre perla y célula pueden variar para ampliar o eliminar selectivamente los linfocitos T (tales como de memoria o efectores o activados) específicos de antígeno o expuestos a antígeno, a diferencia de otros tipos celulares tales como los linfocitos T indiferenciados o de tipo indiferenciado. En un caso, la proporción particular entre perla y célula utilizada elimina selectivamente los linfocitos T específicos de antígeno. Específicamente, proporciones entre perla y célula, tal como proporciones entre perla y célula iguales o superiores a 1:1 y/o proporciones elevadas entre perla y célula, tales como de al menos o de al menos aproximadamente 3:1, 5:1, 10:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1, y superiores, pueden inducir la eliminación de linfocitos T específicos de antígeno. Sin quedar ligados a teoría alguna, se cree que los linfocitos T específicos de antígeno están sensibilizados a una estimulación adicional. Por tanto, en algunos casos, la intensidad de la señal de activación enviada a un linfocito T a través del reactivo o la composición puede influir en la ampliación y/o muerte de uno o más subconjuntos específicos de linfocitos T. En algunos aspectos, la ampliación selectiva de linfocitos T de memoria (linfocitos T específicos de antígeno) puede producirse con señales a través del TCR y/o correceptores que son débiles en comparación con otras señales; mientras que en algunos casos, la eliminación selectiva de linfocitos T de memoria y/o de otros linfocitos T expuestos a antígeno, sin afectar a las células indiferenciadas, puede producirse tras la incubación con reactivos que emiten señales relativamente más fuertes. La cantidad de los receptores CD3/TCR (y CD28) que están unidos por ligandos, entre otros factores, puede, en algunos aspectos, determinar o contribuir a determinar la intensidad de la señal. Por tanto, la estimulación con altas proporciones entre perla y célula en algunos contextos puede proporcionar una alta concentración de anticuerpo estimulante (es decir, una señal "fuerte"), lo que conduce a una sobreestimulación de los linfocitos T específicos de antígeno, causándoles la muerte, ya sea por apoptosis o por otros mecanismos. Por tanto, a este respecto, las composiciones de perlas descritas en el presente documento pueden, en algunos contextos y/o con respecto a determinadas composiciones, funcionar como una composición pro-apoptótica. En algunos aspectos, la señal no debe ser demasiado fuerte como para destruir también a los linfocitos T de tipo indiferenciado, tal como también por muerte celular inducida por activación. En algunos casos, la proporción de un reactivo de perla estimulador, p. ej., un reactivo de perla anti-CD3/anti-CD28, es inferior a 10:1.

Además, a este respecto, en determinados casos, dicho reactivo o composición utilizado en condiciones pro-apoptóticas, p. ej., con respecto a determinados tipos de células (p. ej., una superficie que tiene unida a la misma un agente que estimula una parte de la superficie celular, tal como las composiciones de perlas descritas en el presente documento) se usa para ampliar la población restante de células para su uso en cualquier diversidad de entornos inmunoterápicos descritos en el presente documento. En un caso adicional, la proporción particular entre perla y célula utilizada amplía selectivamente linfocitos T de tipo indiferenciado. La proporción particular puede ajustarse para generar la ampliación deseada de linfocitos T particulares o la eliminación de linfocitos T particulares. Por lo tanto, las

composiciones y métodos descritos en el presente documento pueden utilizarse para ampliar poblaciones específicas de linfocitos T en la población de la composición de entrada, o para eliminar poblaciones específicas de linfocitos T en la población de la composición de entrada, para su uso en cualquier diversidad de entornos inmunoterápicos descritos en el presente documento.

5 Además, a este respecto, en determinados casos, el mismo reactivo o sustancia o composición utilizado como composición pro-apoptótica tal como con respecto a determinados tipos de células (p. ej., una superficie que tiene unida a la misma un agente que estimula una parte de la superficie celular, tal como las composiciones de perlas descritas en el presente documento) se usa para ampliar la población restante de células para su uso en cualquier  
10 diversidad de entornos inmunoterápicos descritos en el presente documento. El uso de proporciones más bajas entre perla y célula proporciona una señal de estimulación a los linfocitos T específicos de antígeno que no sobreestimula, sino que induce una rápida proliferación de estas células. En un caso adicional, la proporción particular entre perla y célula utilizada amplía selectivamente los linfocitos T específicos de antígeno. En algunos aspectos, puede utilizarse cualquier proporción siempre que se produzca la ampliación o eliminación deseada. Por lo tanto, las composiciones y  
15 métodos descritos en el presente documento pueden usarse para ampliar poblaciones específicas de linfocitos T, o para eliminar poblaciones específicas de linfocitos T, para su uso en cualquier diversidad de entornos inmunoterápicos descritos en el presente documento.

20 El uso de determinadas metodologías puede ser ventajoso para mantener la estimulación prolongada de una población de linfocitos T tras la activación y estimulación iniciales, separando los linfocitos T del estímulo tras un periodo de aproximadamente 2 a 14 días. La tasa de proliferación de linfocitos T se controla periódicamente (p. ej., a diario), por ejemplo, examinando el tamaño o midiendo el volumen de los linfocitos T, tal como con un Contador Coulter. A este respecto, un linfocito T en reposo tiene un diámetro medio de aproximadamente 6,8 micrómetros, y tras la activación y estimulación iniciales, en presencia del ligando estimulante, el diámetro medio de los linfocitos T aumentará a más  
25 de 12 micrómetros el día 4 y empezará a disminuir aproximadamente el día 6. Cuando el diámetro medio de los linfocitos T disminuye hasta aproximadamente 8 micrómetros, los linfocitos T pueden reactivarse y reestimularse para inducir una mayor proliferación de los linfocitos T. De manera alternativa, la tasa de proliferación de linfocitos T y el tiempo de reestimulación de los mismos, pueden controlarse mediante ensayos para detectar la presencia de moléculas de superficie celular, tales como, CD154, CD54, CD25, CD137, CD134, que se inducen en los linfocitos T  
30 activados.

Para inducir la estimulación prolongada de una población de linfocitos T CD4+ y/o CD8+, puede ser necesario reactivar y reestimular los linfocitos T con un agente estimulador, tal como un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28 (p. ej., B-T3, XR-CD28 (Diaclone, Besançon, Francia)) varias veces para producir una población de linfocitos CD4+ o  
35 CD8+ cuyo número se multiplicara desde aproximadamente 10 a aproximadamente 1.000 veces la población original de linfocitos T. Por ejemplo, en un caso de la presente divulgación, los linfocitos T se estimulan como se describe durante 2-3 veces. En otros casos, los linfocitos T se estimulan como se describe durante 4 o 5 veces. Utilizando la presente metodología, es posible conseguir un número de linfocitos T entre aproximadamente 100 y aproximadamente 100.000 veces mayor que haya aumentado la policlonalidad en comparación con antes de la estimulación. Por otra  
40 parte, los linfocitos T ampliados por el método de la presente divulgación secretan niveles sustanciales de citocinas (p. ej., IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, GM-CSF y TNF- $\alpha$ ) en los sobrenadantes de cultivo. Por ejemplo, en comparación con la estimulación con IL-2, los linfocitos T CD4+ ampliados mediante el uso de coestimulación anti-CD3 y anti-CD28 secretan altos niveles de GM-CSF y TNF- $\alpha$  en el medio de cultivo. Estas citocinas pueden purificarse a partir de los sobrenadantes de cultivo o los sobrenadantes pueden utilizarse directamente para mantener las células en cultivo. De  
45 manera similar, los linfocitos T ampliados por el método de la presente divulgación junto con el sobrenadante de cultivo y las citocinas, pueden administrarse para favorecer el crecimiento de las células *in vivo*.

En un caso, se realiza la estimulación de linfocitos T, por ejemplo, con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 co-inmovilizados en perlas (perlas 3 $\times$ 28), durante un periodo de tiempo suficiente para que las células vuelvan a un  
50 estado inactivo (baja o nula proliferación) (aproximadamente 8-14 días después de la estimulación inicial). A continuación, se retira la señal de estimulación de las células y éstas se lavan y se infunden de nuevo al paciente. Al final de la fase de estimulación, las células se vuelven "superinducibles" mediante los métodos de la presente divulgación, como lo demuestra su capacidad para responder contra antígenos y la capacidad de estas células para demostrar un fenotipo de tipo memoria, como lo demuestran los ejemplos. Por consiguiente, tras la reestimulación  
55 exógena o por un antígeno *in vivo* después de la infusión, los linfocitos T activados muestran una respuesta sólida caracterizada por propiedades fenotípicas únicas, tal como expresión sostenida de CD 154, aumento de la producción de citocinas, etc.

En otros casos de la presente divulgación, las células, tales como linfocitos T, se combinan con perlas recubiertas o  
60 conjugadas con agente, las perlas y las células se separan posteriormente, y después, las células se cultivan. En un caso alternativo, antes del cultivo, las células y las perlas recubiertas o conjugadas con agente no se separan sino que se cultivan conjuntamente. En un caso adicional, primero se concentran las perlas y las células mediante la aplicación de una fuerza, dando lugar al ligamiento de una parte de la superficie celular, induciendo de este modo la estimulación celular y/o la polarización de la señal de activación.

65 Como ejemplo, cuando los linfocitos T son la población celular diana, las partes de la superficie celular pueden ligarse

permitiendo que las perlas paramagnéticas, a las que se unen anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (perlas 3×28), entren en contacto con los linfocitos T preparados. En un caso, las células (por ejemplo, de 104 a 109 linfocitos T) y las perlas (por ejemplo, perlas paramagnéticas DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T a una proporción de 1:1) se combinan en un tampón, preferentemente PBS (sin cationes divalentes, tales como calcio y magnesio). En algunos aspectos, puede utilizarse cualquier concentración de células. Por ejemplo, la célula diana puede ser muy poco frecuente en la muestra y comprender sólo el 0,01 % de la muestra o toda la muestra (es decir, el 100 %) puede comprender la célula diana de interés. Por consiguiente, cualquier número de célula está dentro del contexto de la presente divulgación. En determinados casos, puede ser deseable disminuir significativamente el volumen en el que las partículas y las células se mezclan (es decir, aumentar la concentración de células), para garantizar un máximo contacto de células y partículas. Por ejemplo, en un caso, se utiliza una concentración de aproximadamente 2 mil millones de células/ml. En otro caso, se utilizan más de 100 millones de células/ml. En un caso adicional, puede utilizarse una concentración de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 millones de células/ml. En otro caso más, se utiliza una concentración de células de 75, 80, 85, 90, 95 o 100 millones de células/ml. En otros casos, pueden utilizarse concentraciones de 125 o 150 millones de células/ml. El uso de altas concentraciones puede dar como resultado un mayor rendimiento celular, activación celular y ampliación celular. Además, el uso de altas concentraciones celulares permite una captura más eficaz de células que pueden expresar débilmente antígenos diana de interés, tales como los linfocitos T CD28 negativos. Dichas poblaciones de células pueden tener valor terapéutico y sería deseable obtenerlas. Por ejemplo, el uso de una alta concentración de células permite una selección más eficaz de linfocitos T CD8+ que normalmente tienen una expresión más débil de CD28.

En un caso relacionado, puede ser deseable usar concentraciones más bajas de células. Diluyendo significativamente la mezcla de linfocitos T y partículas, se minimizan las interacciones entre partículas y células. De este modo, se seleccionan las células que expresan cantidades elevadas de los antígenos deseados que se unirán a las partículas. Por ejemplo, los linfocitos T CD4+ expresan niveles más altos de CD28 y son capturados y estimulados con mayor eficacia que los linfocitos T CD8+ en concentraciones diluidas. En un caso, la concentración de células utilizada es de aproximadamente  $5 \times 10^6$ /ml. En otros casos, la concentración utilizada puede ser de aproximadamente  $1 \times 10^5$ /ml a aproximadamente  $1 \times 10^6$ /ml, y cualquier valor entero entre ambos.

El tampón en el que se suspenden las células puede ser cualquiera que sea apropiado para el tipo de célula en particular. Cuando se utilizan determinados tipos de células, el tampón puede contener otros componentes, p. ej., suero al 1-5 %, necesario para mantener la integridad celular durante el proceso. En otro caso, las células y las perlas pueden combinarse en medios de cultivo celular. Las células y las perlas pueden mezclarse, por ejemplo, por rotación, agitación o cualquier medio para mezclar, durante un periodo de tiempo que varía desde un minuto a varias horas. A continuación, se concentra el contenedor de perlas y células mediante una fuerza, tal como colocándolo en un campo magnético. Se eliminan los medios y las células no unidas y se lavan las células adheridas a las perlas u otra superficie, por ejemplo, mediante bombeo a través de una bomba peristáltica, y a continuación se resuspenden en medios adecuados para el cultivo celular.

En un caso de la presente divulgación, la mezcla puede cultivarse durante 30 minutos a varias horas (aproximadamente 3 horas) a aproximadamente 14 días o cualquier valor entero horario o minuto intermedio. En otro caso, la mezcla puede cultivarse durante 21 días. En un caso de la divulgación, las perlas y los linfocitos T se cultivan conjuntamente durante aproximadamente ocho días. En otro caso, las perlas y los linfocitos T se cultivan conjuntamente durante 2-3 días. Como se ha descrito anteriormente, también pueden desearse varios ciclos de estimulación de tal manera que el tiempo de cultivo de los linfocitos T puede ser de 60 días o más. Las condiciones apropiadas para el cultivo de linfocitos T incluyen un medio apropiado (por ejemplo, medio esencial mínimo o medio RPMI 1640 o, X-vivo 15, (BioWhittaker)) que puede contener factores necesarios para la proliferación y la viabilidad, incluyendo suero (p. ej., suero fetal bovino o humano) o interleucina-2 (IL-2), insulina o cualquier otro aditivo para el crecimiento de las células. Los medios pueden incluir RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM,  $\alpha$ -MEM, F-12, X-Vivo 15 y X-Vivo 20, con aminoácidos y vitaminas añadidos, sin suero o complementado con una cantidad apropiada de suero (o plasma) o un conjunto definido de hormonas, y/o una cantidad de citocina(s) suficiente para el crecimiento y la ampliación de linfocitos T. Los antibióticos, p. ej., penicilina y estreptomycin, se incluyen solo en cultivos experimentales, no en cultivos de células que se infunden en un sujeto. Las células diana se mantienen en condiciones necesarias para favorecer el crecimiento, por ejemplo, una temperatura (p. ej., de 37 °C) y atmósfera (p. ej., aire y CO<sub>2</sub> al 5 %) adecuadas.

En un caso de la presente divulgación, las proporciones entre perla:célula pueden adaptarse para obtener un fenotipo de linfocito T deseado. En un caso particular, las proporciones entre perla:célula pueden variar para ampliar o eliminar selectivamente linfocitos T (de memoria) específicos de antígeno. En un caso, la proporción particular entre perla:célula utilizada elimina selectivamente linfocitos T específicos de antígeno. En un caso adicional, la proporción particular entre perla:célula utilizada amplía selectivamente linfocitos T específicos de antígeno. En algunos aspectos, puede utilizarse cualquier proporción siempre que se produzca la ampliación o eliminación deseada de linfocitos T específicos de antígeno. Por lo tanto, las composiciones y métodos descritos en el presente documento pueden usarse para ampliar poblaciones específicas de linfocitos T, o para eliminar poblaciones específicas de linfocitos T, para su uso en cualquier diversidad de entornos inmunoterápicos descritos en el presente documento.

En otro caso, el tiempo de exposición a agentes estimuladores, tales como perlas recubiertas con anti-CD3/anti-CD28

(es decir, 3×28), puede modificarse o adaptarse de tal manera que se obtenga un fenotipo de linfocitos T deseado. De manera alternativa, una población deseada de linfocitos T puede seleccionarse utilizando diversas técnicas de selección, antes de la estimulación. Se puede desear una mayor población de linfocitos T auxiliares (TH, *helper T*), normalmente CD4+ en lugar de linfocitos T citotóxicos o reguladores CD8+, porque una ampliación de linfocitos TH podría mejorar o restaurar la capacidad de respuesta inmunitaria general. Aunque muchas respuestas inmunitarias específicas están mediadas por linfocitos T específicos de antígeno CD8+, que pueden causar directamente la lisis de células diana o destruirlas, la mayoría de las respuestas inmunitarias requieren la ayuda de linfocitos T CD4+, que expresan importantes moléculas inmunorreguladoras, tales como GM-CSF, CD40L e IL-2, por ejemplo. Cuando se prefiere la ayuda mediada por CD4, un método, tal como el que se describe en el presente documento, que preserve o mejore la proporción CD4:CD8, podría ser muy beneficioso. El aumento del número de linfocitos T CD4+ puede aumentar la cantidad de CD40L expresada por las células introducidas en los pacientes, mejorando posiblemente la visibilidad de las células diana (mejora de la función de las APC). Pueden observarse efectos similares al aumentar el número de células infundidas que expresan GM-CSF o IL-2, todas ellas expresadas predominantemente por linfocitos T CD4+. Asimismo, en determinadas aplicaciones, puede ser deseable utilizar una población de linfocitos T reguladores (p. ej., *Autoimmun Rev.* Agosto de 2002; 1(4): 190-7; *Curr Opin Immunol.* Diciembre de 2002; 14(6):771-8) que pueda generarse y ampliarse utilizando los métodos descritos en el presente documento. De manera alternativa, en situaciones en las que la ayuda de los CD4 es menos necesaria y se desea aumentar el número de linfocitos T CD8+, también pueden utilizarse los enfoques XCELLERATE™ descritos en el presente documento, mediante, por ejemplo, preselección de linfocitos CD8+ antes de la estimulación y/o cultivo. Pueden darse situaciones de este tipo en las que se prefiera un aumento de los niveles de IFN-γ o un aumento de la citólisis de una célula diana. También se puede modificar el tiempo y el tipo de exposición a los agentes estimuladores para ampliar linfocitos T con un repertorio de TCR deseado, p. ej., expresar genes deseados de la familia Vβ.

Para efectuar el aislamiento de diferentes poblaciones de linfocitos T, los tiempos de exposición a las partículas pueden variar. Por ejemplo, en un caso preferido, los linfocitos T se aíslan mediante incubación con perlas 3×28, tal como DYNABEADS® M-450, durante un periodo de tiempo suficiente para la selección positiva de los linfocitos T deseados. En un caso, el periodo de tiempo es de aproximadamente 30 minutos. En un caso adicional, el periodo de tiempo es de al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 horas. Incluso en otro caso preferido, el periodo de tiempo es de 10 a 24 horas o más. En un caso preferido, el periodo del tiempo de incubación es o es de aproximadamente 24 horas. Para el aislamiento de linfocitos T de pacientes con cáncer, el uso de tiempos de incubación más largos, tal como de al menos o de al menos aproximadamente 24 horas, puede aumentar el rendimiento celular.

En determinados casos, los tiempos totales de estimulación y/o ampliación pueden ser de entre 2 y 15 días, entre 2 y 12 días, entre 2 y 12 días, entre 2 y 8 días, entre 2 y 6 días, entre 2 y 4 días, entre 4 y 12 días, entre 4 y 10 días, entre 4 y 8 días, entre 4 y 6 días, entre 6 y 12 días, entre 6 y 10 días, entre 6 y 8 días, entre 8 y 12 días, entre 8 y 10 días o entre 10 y 12 días, todos los intervalos inclusive. En algunos casos, las células se incuban y/o se incuban con un reactivo estimulante (por ejemplo, una partícula como se describe en el presente documento) durante al menos o al menos aproximadamente 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días o más de 14 días. Cuando la estimulación de los linfocitos T se lleva a cabo durante periodos de tiempo más cortos, la población de linfocitos T puede no aumentar en número, puede que su número no aumente tan drásticamente, puede disminuir en número, o puede permanecer igual en número, pero la población proporcionará linfocitos T activados más fuertes y sanos que pueden seguir proliferando *in vivo* y/o parecerse más al conjunto de linfocitos T efectores naturales. Por ejemplo, cuando la estimulación de los linfocitos T se lleva a cabo durante periodos de tiempo más cortos, la población de linfocitos T puede comprender un mayor porcentaje y/o proporción de linfocitos T indiferenciados o de tipo no indiferenciado, o de linfocitos T genomodificados, en comparación con un proceso paralelo en donde la estimulación de los linfocitos T se lleva a cabo durante un periodo de tiempo más largo. En algunos casos, un periodo de tiempo más corto puede caracterizarse por un tiempo de incubación total, en algunos casos, un tiempo de incubación total con un agente estimulador, de menos de o de menos de aproximadamente 6 días, menos de o de menos de aproximadamente 5 días, menos de o de menos de aproximadamente 4 días, menos de o de menos de aproximadamente 3 días, o menos de o de menos de aproximadamente 2 días. Dado que la disponibilidad de los linfocitos T auxiliares suele ser el factor limitante en las respuestas de los anticuerpos a los antígenos proteicos, la capacidad de ampliar selectivamente o infundir selectivamente una población de linfocitos T rica en CD4+ en un sujeto, es extremadamente beneficiosa. Otras ventajas de estas poblaciones enriquecidas se aprecian fácilmente, ya que los linfocitos T auxiliares activados que reconocen los antígenos presentados por los linfocitos B, proporcionan dos tipos de estímulos, contacto físicamente y producción de citocinas, que dan lugar a la proliferación y diferenciación de linfocitos B.

En algunos casos, las condiciones estimulantes no comprenden componentes o agentes de cultivo que se complementan para preservar subconjuntos particulares de linfocitos T, por ejemplo, linfocitos T de tipo no indiferenciado. Por lo tanto, en algunos casos, la eliminación de componentes o agentes del cultivo de las condiciones estimulantes puede contribuir a la eliminación de linfocitos T de tipo no indiferenciado. En algunos casos, las condiciones estimulantes no incluyen agentes, tales como N-acetil cisteína, que pueden utilizarse para modular y/o ajustar la intensidad de la señalización de TCR/CD3. En algunos aspectos, dichos agentes se eliminan o reducen en cantidades/proporciones para aumentar la fuerza de la señal activadora. En algunos aspectos, la condición estimuladora se lleva a cabo, o se lleva a cabo adicionalmente, excluyendo o reduciendo la concentración de reactivos de cultivo que se sabe o que es probable que reduzcan la MCIA y/o que promuevan la supervivencia de células más

maduras, tal como de células no indiferenciadas. En algunos casos, la condición estimulante no incluye N-acetil cisteína o incluye N-acetil cisteína en una cantidad o concentración reducida. En algunos casos, la condición estimulante no incluye una IL-7 y/o IL-15 recombinante o incluye una cantidad o concentración reducida de IL-7 o IL-15 recombinante. En algunos casos, podrían incluirse aditivos de cultivo que ayuden o promuevan adicionalmente la eliminación de células no indiferenciadas (p. ej., toxina unida a CD45RO).

### C. Composición estimulada

También se desvela una composición estimulada producida por los métodos de incubación (p. ej., estimulación) descritos. En algunos casos, las células de la composición estimulada también se genomodifican, p. ej., para introducir un receptor de antígeno genomodificado, después de la incubación de la composición de entrada. En algunos casos, el método incluye además la incubación en presencia de uno o más agentes estimulantes durante la fase de genomodificación.

Las células de la composición estimulada que no han sufrido apoptosis utilizando los métodos de incubación (p. ej., estimulación) descritos en el presente documento, pueden aumentar la policlonalidad de dicha población restante de linfocitos T, medida a través de la amplitud de la respuesta de la población a un antígeno dado. El restablecimiento o aumento de la policlonalidad puede medirse determinando la amplitud de la respuesta a un antígeno de interés particular, por ejemplo, midiendo el número de epítomos diferentes reconocidos por las células específicas de antígeno. Esto puede llevarse a cabo utilizando técnicas estándar para generar y clonar linfocitos T específicos de antígeno *in vitro*.

En algunos casos de los métodos desvelados en el presente documento, las condiciones de cultivo inducen preferentemente la ampliación, proliferación y/o supervivencia de linfocitos T de tipo no indiferenciado en comparación con los linfocitos T de tipo indiferenciado. La ampliación, proliferación y/o supervivencia preferente de un primer tipo o población celular en comparación con un segundo tipo o población celular significa que la ampliación, proliferación y/o supervivencia relativa es mayor para el primer tipo o población que para el segundo. Esto puede incluir un escenario en el que el porcentaje del primer tipo o población celular ampliada, proliferada y/o que haya sobrevivido es mayor, y/o que el grado (p. ej., grado global o promedio entre las células de la población o tipo) al que se expanden, proliferan y/o sobreviven las células es mayor para la primera población o tipo que para la segunda.

En algunos casos, la expansión, proliferación y/o supervivencia preferente se expresa comparando el porcentaje de células de tipo indiferenciado en la composición de entrada con el porcentaje de células genomodificadas en la composición estimulada que proceden de células de tipo indiferenciado en la composición de entrada original. En algunos ejemplos, el porcentaje de células genomodificadas de la composición estimulada, de la que se obtienen células de tipo indiferenciado de la composición de entrada original, es generalmente mayor que el de las primeras en las condiciones estimulantes descritas en el presente documento. Por ejemplo, en un caso, el porcentaje de células de la composición estimulada de la que se obtienen células de tipo indiferenciado de la composición de entrada original, es mayor que el porcentaje de células indiferenciadas de la composición iniciadora de cultivo. En un aspecto, la composición de entrada (o los linfocitos T que contiene) incluye o incluye aproximadamente un 70 % de linfocitos T de tipo indiferenciado y un 30 % de linfocitos T de tipo no indiferenciado, mientras que es superior al 50 %, p. ej., al menos un 70 %, de las células genomodificadas en la composición estimulada resultante que proceden de células de tipo indiferenciado en la composición de entrada. En algunos casos, usando otras condiciones, tal como una estimulación con agente(s) que induce(n) una señal fuerte a través del complejo TCR, daría como resultado menos del 50 %, p. ej., en o aproximadamente del 5-10 % de las células de la composición estimulada sean de origen de tipo no indiferenciado. En algunos casos, las condiciones estimulantes inducen una señal fuerte que induce la muerte celular inducida por activación en linfocitos T de tipo no indiferenciado de la composición de entrada.

En algunos casos, el porcentaje de linfocitos T de tipo indiferenciado o de células procedentes de los linfocitos T de tipo indiferenciado de la composición de entrada en la composición estimulada se multiplica por más de, o más de aproximadamente, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 50 veces, 100 veces en comparación con la composición de entrada. En algunos casos, la proporción de células procedentes de los linfocitos T de tipo indiferenciado de la composición de entrada en comparación con las células procedentes de los linfocitos T de tipo no indiferenciado de la composición de entrada o la proporción de linfocitos T de tipo indiferenciado en comparación con los linfocitos T de tipo no indiferenciado en la composición estimulada se multiplica por más de, o más de aproximadamente, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 50 veces, 100 veces en comparación con la proporción de linfocitos T de tipo indiferenciado frente a linfocitos T de tipo no indiferenciado en la composición de entrada. En algunos casos, la composición estimulada comprende más del 75 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de células que proceden de linfocitos T de tipo indiferenciado de la composición de entrada.

En algunos casos de uso del método de estimulación de linfocitos T descrito en el presente documento, de la células de la composición de entrada, un mayor porcentaje de los linfocitos T de tipo indiferenciado, en comparación con los linfocitos T de tipo no indiferenciado, se inducen a proliferar y/o se activan. En algunos aspectos, la composición estimulada resultante de los métodos de estimulación descritos en el presente documento contiene menos del 10 % de células procedentes de linfocitos T de tipo no indiferenciado. En algunos casos, la composición estimulada contiene



menos del 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 % o 0,1 % de células procedentes de linfocitos T no indiferenciados. En algunos casos, un mayor porcentaje de los linfocitos T que eran de tipo indiferenciado en la composición de entrada, en comparación con el porcentaje de los linfocitos T que eran de tipo no indiferenciado en la composición de entrada, se divide los días 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 después de iniciar dicha incubación. En algunos casos, las condiciones estimulantes inducen la muerte celular. En ejemplos particulares, las condiciones estimulantes del método inducen la activación de linfocitos T de tipo no indiferenciado, induciendo de este modo la muerte celular inducida por activación (MCIA).

En algunos casos, el método incluye condiciones estimulantes capaces de inducir la proliferación de un mayor porcentaje de células de la población de linfocitos T de tipo indiferenciado, en comparación con los linfocitos T de tipo no indiferenciado, los días 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 después de iniciar la incubación en las condiciones.

En algunos casos, las condiciones estimulantes producen una composición estimulada, en donde las condiciones estimulantes inducen preferentemente la ampliación de linfocitos T de tipo indiferenciado de tal manera que se produce una cantidad diana de linfocitos T de la composición estimulada procedente de linfocitos T de tipo indiferenciado de la composición de entrada. En algunos casos, la composición estimulada también se ajusta para lograr una proporción preferida de linfocitos T CD4:CD8. En algunos casos, se pueden eliminar poblaciones celulares particulares de la composición estimulada para conseguir una proporción CD4:CD8 preferida.

En algunos casos, las condiciones estimulantes, p. ej., en las que se incuban las composiciones de entrada, inducen preferentemente la ampliación, proliferación y/o supervivencia de linfocitos T de tipo indiferenciado o un subconjunto de los mismos en comparación con linfocitos T de tipo no indiferenciado o un subconjunto de los mismos. En algunos aspectos, las condiciones estimulantes activan fuertemente los linfocitos T de tipo no indiferenciado de la composición de entrada, activando de este modo la muerte celular particularmente en los linfocitos T de tipo no indiferenciado de la composición de entrada. En algunos aspectos, de este modo se favorece preferentemente la supervivencia de los linfocitos T de tipo indiferenciado. En algunos aspectos, dichas condiciones estimulantes conducen a un nivel reducido de toxicidad y/o a resultado(s) o síntoma(s) asociado(s) a la toxicidad después de la administración a los sujetos de las células y composiciones producidas por los métodos.

La inducción de una respuesta determinada o su inducción preferente en una población con respecto a otra puede medirse mediante diversos métodos. Por ejemplo, la inducción de una célula a entrar en el ciclo celular puede medirse mediante métodos basados en citometría de flujo, incluidos los que implican el uso de colorantes y otros agentes, tales como CFSE y otros agentes intercalantes para evaluar la división celular, seguida de una evaluación por citometría de flujo, evaluación de la incorporación de timidina marcada con tritio (H3) y agentes similares, y/o recuento de células. Las comparaciones pueden hacerse evaluando varias poblaciones de pruebas puras, tal como mediante la comparación de poblaciones de linfocitos T indiferenciados y no indiferenciados en condiciones particulares, por separado. La activación puede medirse, por ejemplo, a través de la secreción de diversas citocinas y/o la regulación en aumento o la expresión de diversos marcadores de activación, entre los que se incluyen, CD25, CD69, y/o el tamaño celular (p. ej., dispersión directa medida por citometría de flujo). La supervivencia y/o la apoptosis pueden evaluarse mediante diversos métodos, incluidos los métodos de citometría de flujo, la incorporación de diversos colorantes, incluido el yoduro de propidio, y la tinción con agentes tales como la tinción con anexina V y agentes similares.

En algunos casos, el porcentaje de linfocitos T de tipo indiferenciado en la composición de entrada es menor que el porcentaje de linfocitos T en la composición estimulada procedente de linfocitos T de tipo indiferenciado en la composición de entrada. En algunos casos, los métodos desvelados en el presente documento que producen un mayor porcentaje de las células introducidas con el ácido nucleico son, o se obtienen de la proliferación de, linfocitos T de tipo indiferenciado en la composición de entrada, en comparación con los linfocitos T de tipo no indiferenciado en la composición de entrada. Se desvelan diversos ajustes de las condiciones estimulantes para favorecer respuestas y/o los resultados en tipos celulares particulares, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. N.º 8.617.884, y en la solicitud de patente de EE.UU. N.º de publicación: US 20030235908 A1.

En algunos casos, la composición estimulada contiene células que expresan o se obtienen de células que expresan marcadores particulares de linfocitos T de tipo indiferenciado. Por ejemplo, la composición estimulada producida por los métodos desvelados se obtiene de poblaciones de células que son positivas en superficie para un marcador de activación de linfocitos T seleccionado del grupo que consiste en CD27, CD28, CD45RA y CCR7. En algunos casos, la composición estimulada producida por los métodos desvelados se obtiene de poblaciones de células que son negativas en superficie para un marcador de activación de linfocitos T tal como CD62L. En algunos aspectos, las células de la composición estimulada son, o proceden de, células cuya superficie es negativa para CD56 y/o CD45RO. En algunos casos particulares, la composición estimulada producida por los métodos desvelados se obtiene de poblaciones de células que son CD27+, CD45RA+, CD45RO- y CCR7+. En algunos casos, las células de la composición estimulada son, o proceden de, células que son negativas para la expresión intracelular de una citocina tal como IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4 y/o IL-10. En otros ejemplos, las células de la composición estimulada son, o proceden de, células que son negativas para la expresión de los marcadores CD25 y/o perforina. En algunos casos, las células de la composición estimulada son, o proceden de, células que son CD95<sup>lo</sup>.



En algunos casos, la composición estimulada contiene células que proceden de al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, o al menos un 90 % de linfocitos T que son positivos en superficie para un marcador de activación de linfocitos T tal como CD27, CD28, CD45RA y CCR7 y negativos en superficie para CD62L. En algunos casos, la composición estimulada contiene células que proceden de al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, o al menos un 90 % de los linfocitos T que son negativos en superficie para CD56 y/o CD45RO. En algunos aspectos, la composición estimulada contiene células que proceden de al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, o al menos un 90 % de los linfocitos T que son negativos para la expresión intracelular de una citocina tal como la IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10. En algunos aspectos, la composición estimulada contiene células que proceden de al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, o al menos un 90 % de los linfocitos T que son negativos para la expresión de los marcadores CD25 y/o perforina. En algunos casos, la composición estimulada contiene células que proceden de al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, o al menos un 90 % de los linfocitos T que son CD95<sup>+</sup>.

En determinados casos, la composición estimulada es más policlonal o multiclonal en comparación con la composición de entrada. En algunos casos, la composición estimulada es más diversa en comparación con la composición de entrada. En algunos casos, este aumento de la policlonalidad comprende un desplazamiento de la mono a la oligoclonalidad o a la policlonalidad de la población de linfocitos T medido a través de un perfil de espectratipos de V $\beta$ , V $\alpha$ , V $\gamma$  o V $\delta$  de al menos un gen de la familia de V $\beta$ , V $\alpha$ , V $\gamma$  o V $\delta$ . La estimulación y activación de las células restantes que han sobrevivido, que se han ampliado y proliferado, utilizando los métodos desvelados, puede aumentar la policlonalidad de dichos linfocitos T restantes de la composición estimulada, medida a través de la amplitud de la respuesta de la población a un antígeno dado. La restauración o el aumento de la policlonalidad de la composición estimulada puede medirse determinando la amplitud de la respuesta a un antígeno de interés particular, por ejemplo, midiendo el número de epítomos diferentes reconocidos por las células específicas de antígeno. Esto puede llevarse a cabo utilizando técnicas estándar para generar y clonar linfocitos T específicos de antígeno *in vitro*.

## II. MÉTODOS DE GENOMODIFICACIÓN DE CÉLULAS

En algunos casos, el método incluye además la introducción de un receptor recombinante genomodificado, p. ej., un receptor quimérico, tal como el receptor quimérico para el antígeno (CAR), en la composición estimulada de linfocitos T, generando una composición de salida que comprenda linfocitos T que expresen el receptor recombinante genomodificado. En algunos casos, la incubación de la composición de entrada en condiciones estimulantes se realiza antes, durante y/o después de la introducción de un ácido nucleico que codifica un receptor recombinante genomodificado. En algunos ejemplos, la introducción es por transducción. En algunos casos, los métodos desvelados producen una composición estimulada que puede transducirse uniformemente. En algunos aspectos, el ácido nucleico contiene un vector vírico. En algunos casos, el vector vírico es un vector retrovírico. En algunos ejemplos, el vector vírico es un vector lentivírico o un vector gammaretrovírico. El método, en algunos casos, incluida la introducción, se realiza *in vitro* o *ex vivo*.

Por tanto, los métodos desvelados en el presente documento incluyen una o más etapas para preparar células para su genomodificación. En determinados casos, la una o más etapas incluyen el aislamiento de células de una muestra biológica, la estimulación de una composición de células de entrada, y la preparación de una composición de células que van a genomodificarse. También se desvelan poblaciones de dichas células, composiciones que contienen dichas células y/o que están enriquecidas de dichas células, tales como en el que las células que expresan el receptor recombinante, p. ej., un receptor quimérico, constituyen al menos el 50, 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 por ciento o más del total de células en la composición o células de un determinado tipo, tal como linfocitos T o linfocitos CD8<sup>+</sup> o CD4<sup>+</sup>. Entre las composiciones se encuentran composiciones farmacéuticas y formulaciones para administración, tal como para la terapia celular adoptiva. También se desvelan métodos para genomodificar, producir o generar dichas células, métodos para administrar las células y composiciones a sujetos, p. ej., pacientes y métodos para detectar, seleccionar, aislar o separar dichas células. Por tanto, se desvelan células genomodificadas que expresan los receptores recombinantes, p. ej., los CAR.

En algunos casos, las células incluyen uno o más ácidos nucleicos introducidos mediante genomodificación, y de ese modo expresan productos recombinantes o genomodificados de dichos ácidos nucleicos. En algunos casos, los ácidos nucleicos son heterólogos, es decir, que 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 genomodificando y/o en un organismo del que se obtiene dicha célula. En algunos casos, los ácidos nucleicos no son de origen natural, tal como un ácido nucleico que no se encuentra en la naturaleza, incluyendo uno que comprende combinaciones quiméricas de ácidos nucleicos que codifican diversos dominios de múltiples tipos de células diferentes.

### A. Genomodificación

### 1. Receptores de antígenos recombinantes

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

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

En algunos casos, el receptor quimérico contiene además un dominio extracelular de unión a ligando que se une específicamente a un antígeno ligando (p. ej. antígeno). En algunos casos, el receptor quimérico es un CAR que contiene un dominio extracelular de reconocimiento de antígeno que se une específicamente a un antígeno. En algunos casos, el ligando, tal como un antígeno, es una proteína que se expresa en la superficie de las células. En algunos casos, el CAR es un CAR de tipo TCR y el antígeno es un antígeno peptídico procesado, tal como un antígeno peptídico de una proteína intracelular, que, al igual que un TCR, es reconocido en la superficie celular en el contexto de una molécula del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, *major histocompatibility complex*).

Como receptores de antígenos ilustrativos, incluidos los CAR, y los métodos para genomodificar e introducir dichos receptores en las células, se incluyen los descritos, por ejemplo, en las publicaciones de solicitud de patente internacional número WO2000/14257, WO2013/126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061, en las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos número US2002131960, US2013287748, US20130149337, en las patentes de Estados Unidos N.º: 6.451.995, 7.446.190, 8.252.592, 8.339.645, 8.398.282, 7.446.179, 6.410.319, 7.070.995, 7.265.209, 7.354.762, 7.446.191, 8.324.353 y 8.479.118, y en la solicitud de patente europea número EP2537416, y/o en las descritas por Sadelain *et al.*, *Cancer Discov.* Abril de 2013; 3(4): 388-398; Davila *et al.* (2013) *PLoS ONE* 8(4): e61338; Turtle *et al.*, *Curr. Opin. Immunol.*, octubre de 2012; 24(5): 633-39; Wu *et al.*, *Cancer*, 18 de marzo de 2012 (2): 160-75. En algunos aspectos, los receptores de antígeno incluyen un CAR como se describe en la patente de Estados Unidos N.º: 7.446.190 y los descritos en la publicación de solicitud de patente internacional N.º: WO/2014055668 A1. Como ejemplos de los CAR incluyen los CAR que se desvelan en cualquiera de las publicaciones mencionadas anteriormente, tal como WO2014031687, US 8339645, US 7446179, US 2013/0149337, patente de Estados Unidos N.º: 7.446.190, patente de Estados Unidos N.º: 8389282, Kochenderfer *et al.*, 2013, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10, 267-276 (2013); Wang *et al.* (2012) *J. Immunother.* 35(9): 689-701; y Brentjens *et al.*, *Sci Transl Med.* 2013 5(177). Véanse también los documentos WO2014031687, US 8339645, US 7446179, US 2013/0149337, patente de Estados Unidos N.º: 7.446.190 y patente de Estados Unidos N.º: 8.389.282.

En algunos casos, el CAR se construye con una especificidad por un antígeno (o marcador o ligando) particular, tal como un antígeno expresado en un tipo de célula particular al que se dirigirá la terapia adoptiva, p. ej., un marcador de cáncer y/o un antígeno previsto para inducir una respuesta amortiguadora, tal como un antígeno expresado en un tipo de célula normal o no enferma. Por tanto, el CAR incluye normalmente en su porción extracelular una o más moléculas de unión a antígeno, tales como uno o más fragmentos de unión a antígeno, dominio, o porción, o uno o más dominios variables de anticuerpo, y/o moléculas de anticuerpo. En algunos casos, el CAR incluye una porción de unión a antígeno o porciones de una molécula de anticuerpo, tal como un fragmento de anticuerpo monocatenario (scFv) que proviene de las cadenas pesada variable (VH, *variable heavy*) y ligera variable (VL, *variable light*) de un anticuerpo monoclonal (mAb, *monoclonal antibody*).

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

En algunos casos, el receptor recombinante, tal como un receptor quimérico (p. ej. CAR), incluye un dominio de unión a ligando que se une, tal como se une específicamente, a un antígeno (o a un ligando). Entre los antígenos dirigidos

por los receptores quiméricos se encuentran los expresados en el contexto de una enfermedad, afección o tipo de célula a la que se dirigirá a través de la terapia celular adoptiva. Entre las enfermedades y afecciones se encuentran las enfermedades y trastornos proliferativos, neoplásicos y malignos, incluidos cánceres y tumores, incluidos cánceres hemáticos, cánceres del sistema inmunitario, tales como linfomas, leucemias y/o mielomas, tales como leucemias B, T y mieloides, linfomas y mielomas múltiples.

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

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

En determinados casos, el antígeno es integrina  $\alpha v \beta 6$  (integrina  $\alpha v \beta 6$ ), antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA), B7-H3, B7-H6, anhidrasa carbónica 9 (CA9, también conocida como CAIX o G250), un antígeno del cáncer de testículo, antígeno 1B de cáncer/testículo (CTAG, también conocido como NY-ESO-1 y LAGE-2), antígeno carcinoembrionario (CEA), una ciclina, ciclina A2, ligando 1 de quimiocinas con motivo C-C (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, condroitín sulfato proteoglucano 4 (CSPG4), proteína del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), mutación del receptor del factor de crecimiento epidérmico de tipo III (EGFR VIII), glucoproteína 2 epitelial (EPG-2), glucoproteína 40 epitelial (EPG-40), efrina B2, receptor de efrina A2 (EPHa2), receptor de estrógenos, receptor Fc de tipo 5 (FCRL5; también conocido como receptor Fc homólogo 5 o FCRH5), receptor de acetilcolina fetal (AChR fetal), una proteína de unión a folato (FBP), receptor alfa de folato, gangliósido GD2, GD2 O-acetilado (OGD2), gangliósido GD3, glucoproteína 100 (gp100), glipicano-3 (GPC3), Receptor 5D acoplado a proteína G (GPCR5D), Her2/neu (tirosina cinasa receptora erbB2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), dímeros erbB, antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA) humano, antígeno de superficie de la hepatitis B, antígeno leucocitario humano A1 (HLA-A1), antígeno leucocitario humano A2 (HLA-A2), receptor alfa de IL-22 (IL-22R $\alpha$ ), receptor alfa 2 de IL-13 (IL-13R $\alpha$ 2), receptor del dominio de inserción de cinasa (kdr), cadena ligera kappa, molécula L1 de adhesión celular (L1-CAM), epítipo CE7 de L1-CAM, miembro A de la familia 8 que contiene repeticiones ricas en leucina (LRR8A), Lewis Y, antígeno asociado a melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, mesotelina (MSLN), c-Met, citomegalovirus (CMV) murino, mucina 1 (MUC1), MUC16, ligandos citolíticos naturales del miembro D de grupo 2 (NKG2D), melan A (MART-1), molécula de adhesión celular neural (NCAM), antígeno oncofetal, antígeno preferentemente expresado del melanoma (PRAME), receptor de progesterona, un antígeno específico de próstata, antígeno prostático de células madre (PSCA), antígeno prostático específico de membrana (PSMA), receptor 1 huérfano similar a tirosina cinasa receptora (ROR1), survivina, glucoproteína trofoblástica (TPBG también conocida como 5T4), glucoproteína 72 asociada a tumores (TAG72), proteína 1 relacionada con tirosinasa (TRP1, también conocida como TYRP1 o gp75), proteína 2 relacionada con tirosinasa (TRP2, también conocida como dopacromo tautomerasa, dopacromo delta-isomerasa o DCT), receptor del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR), receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular ((VEGFR2), Tumor de Wilms 1 (WT-1), un antígeno específico de patógeno o expresado por patógeno, o un antígeno asociado con una etiqueta universal, y/o moléculas biotiniladas, y/o moléculas expresadas por el VIH, el VHC, el VHB u otros patógenos. Los antígenos a los que se dirigen los receptores incluyen, en algunos casos, antígenos asociados a una neoplasia maligna de linfocitos B, tal como cualquiera de una serie de marcadores de linfocitos B conocidos. En algunos casos, el antígeno es o incluye CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Igkappa, Iglambda, CD79a, CD79b o CD30.

En algunos casos, el antígeno es o incluye un antígeno específico de patógeno o expresado por patógeno. En algunos casos, 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, el antígeno o dominio de unión a antígeno es CD19. En algunos casos, el scFv contiene una VH y una VL procedentes de un anticuerpo o de un fragmento de anticuerpo específico contra CD19. En algunos casos, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a CD19 es un anticuerpo procedente de ratón, como FMC63 y SJ25C1. En algunos casos, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es un anticuerpo humano, p. ej., como se describe en la publicación de patente de Estados Unidos n.º US 2016/0152723.

En algunos casos, el scFv procede de FMC63. FMC63 se refiere generalmente a un anticuerpo de IgG1 monoclonal de ratón generado contra células Nalm-1 y -16 que expresan CD19 de origen humano (Ling, N. R., *et al.* (1987). Leucocyte typing III. 302). El anticuerpo FMC63 comprende la CDR (región determinante de la complementariedad) H1 y H2 expuestas en las SEQ ID NO: 38, 39 respectivamente, la CDRH3 expuesta en las SEQ ID NO: 40 o 54. la CDRL1 expuesta en las SEQ ID NO: 35 y la CDR L2 36 o 55 y secuencias CDR L3 37 o 34. El anticuerpo FMC63 comprende la región variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 y la región variable de cadena ligera (V<sub>L</sub>) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42. En algunos casos, el scFv comprende una cadena ligera variable que contiene la secuencia CDRL1 de SEQ ID NO:35, una secuencia CDRL2 de SEQ ID NO:36, y una secuencia CDRL3 de SEQ ID NO:37 y/o una cadena pesada variable que contiene una secuencia CDRH1 de SEQ ID NO:38, una secuencia CDRH2 de SEQ ID NO:39, y una secuencia CDRH3

de SEQ ID NO:40. En algunos casos, el scFv comprende una región variable de cadena pesada de FMC63 expuesta en SEQ ID NO:41 y una región variable de cadena ligera de FMC63 expuesta en SEQ ID NO:42. En algunos casos, la cadena pesada variable y la cadena ligera variable están conectadas por un enlazador. En algunos casos, el enlazador es como se expone en la SEQ ID NO: 56. En algunos casos, el scFv comprende, en orden, una V<sub>H</sub>, un enlazador y una V<sub>L</sub>. En algunos casos, el scFv comprende, en orden, una V<sub>L</sub>, un enlazador y una V<sub>H</sub>. En algunos casos, el scFv está codificado por una secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO:57 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: 57. En algunos casos, 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, el scFv procede de SJ25C1. SJ25C1 es un anticuerpo de IgG1 monoclonal de ratón generado contra células Nalm-1 y -16 que expresan CD19 de origen humano (Ling, N. R., *et al.* (1987). Leucocyte typing III. 302). El anticuerpo SJ25C1 comprende las secuencias de CDRH1, H2 y H3 expuestas en las SEQ ID NO: 47-49, respectivamente, y las secuencias de CDRL1, L2 y L3 expuestas en las SEQ ID NO: 44-46, respectivamente. El anticuerpo SJ25C1 comprende la región variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50 y la región variable de cadena ligera (V<sub>L</sub>) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51. En algunos casos, el scFv comprende una cadena ligera variable que contiene la secuencia CDRL1 de SEQ ID NO:44, una secuencia CDRL2 de SEQ ID NO: 45, y una secuencia CDRL3 de SEQ ID NO:46 y/o una cadena pesada variable que contiene una secuencia CDRH1 de SEQ ID NO:47, una secuencia CDRH2 de SEQ ID NO:48, y una secuencia CDRH3 de SEQ ID NO:49. En algunos casos, el scFv comprende una región variable de cadena pesada de SJ25C1 expuesta en SEQ ID NO:50 y una región variable de cadena ligera de SJ25C1 expuesta en SEQ ID NO:51. En algunos casos, la cadena pesada variable y la cadena ligera variable están conectadas por un enlazador. En algunos casos, el enlazador es como se expone en la SEQ ID NO: 52. En algunos casos, el scFv comprende, en orden, una V<sub>H</sub>, un enlazador y una V<sub>L</sub>. En algunos casos, el scFv comprende, en orden, una V<sub>L</sub>, un enlazador y una V<sub>H</sub>. En algunos casos, 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, el antígeno o dominio de unión a antígeno es BCMA. En algunos casos, el scFv contiene una V<sub>H</sub> y una V<sub>L</sub> procedentes de un anticuerpo o de un fragmento de anticuerpo específico contra BCMA. En algunos casos, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a BCMA es o contiene una V<sub>H</sub> y una V<sub>L</sub> de un anticuerpo o de un fragmento de anticuerpo expuesto en las publicaciones de solicitud de patente internacional número WO 2016/090327 y WO 2016/090320.

En algunos casos, el antígeno o dominio de unión a antígeno es GPRC5D. En algunos casos, el scFv contiene una V<sub>H</sub> y una V<sub>L</sub> procedentes de un anticuerpo o de un fragmento de anticuerpo específico contra GPRC5D. En algunos casos, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a GPRC5D es o contiene una V<sub>H</sub> y una V<sub>L</sub> de un anticuerpo o de un fragmento de anticuerpo expuesto en las publicaciones de solicitud de patente internacional número WO 2016/090329 y WO 2016/090312.

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

La referencia al "complejo principal de histocompatibilidad" (CMH) se refiere a una proteína, generalmente una glucoproteína, que contiene un sitio de unión o surco de unión peptídico polimorfo que puede, en algunos casos, formar un complejo con antígenos peptídicos de polipéptidos, incluidos los antígenos peptídicos procesados por la maquinaria celular. En algunos casos, las moléculas del MHC pueden mostrarse o expresarse en la superficie celular, incluido como complejo con péptido, es decir, complejo MHC-péptido, para la presentación de un antígeno en una conformación reconocible por un receptor de antígeno en los linfocitos T, tal como un TCR o un anticuerpo similar al TCR. En general, las moléculas del MHC de clase I son heterodímeros que tienen una cadena  $\alpha$  que atraviesa la membrana, en algunos casos con tres dominios  $\alpha$ , y una microglobulina  $\beta 2$  asociada de manera no covalente. En general, las moléculas del MHC de clase II están compuestas por dos glucoproteínas transmembrana,  $\alpha$  y  $\beta$ , ambas de las cuales normalmente atraviesan la membrana. Una molécula del MHC puede incluir una porción efectiva de un MHC que contenga un sitio o sitios de unión a antígeno para unir un péptido y las secuencias necesarias para el reconocimiento por el receptor de antígeno apropiado. En algunos casos, las moléculas del MHC de clase I suministran péptidos, que se originan en el citosol, a la superficie celular, donde un complejo MHC-péptido es reconocido por los linfocitos T, tal como generalmente linfocitos T CD8<sup>+</sup>, aunque, en algunos casos, linfocitos T CD4<sup>+</sup>. En algunos casos, las moléculas del MHC de clase II suministran péptidos, que se originan en el sistema vesicular, a la superficie celular, donde son reconocidos normalmente por linfocitos T CD4<sup>+</sup>. En general, un grupo de locus relacionados codifica las

moléculas del MHC, que en conjunto recibe el nombre de H-2 en el ratón y antígeno leucocitario humano (HLA, *human leukocyte antigen*) en el ser humano. Por consiguiente, normalmente el MHC humano también puede denominarse antígeno leucocitario humano (HLA).

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

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

En algunos casos, puede producirse un anticuerpo o una porción de unión a antígeno similar al TCR (véanse, p. ej., las solicitudes publicadas de EE.UU. n.º US 2002/0150914; US 2003/0223994; US 2004/0191260; US 2006/0034850; US 2007/00992530; US20090226474; US20090304679; y la publicación PCT internacional n.º WO 03/068201).

En algunos casos, un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un complejo MHC-péptido, puede producirse inmunizando a un hospedador con una cantidad eficaz de un inmunógeno que contenga un complejo MHC-péptido específico. En algunos casos, el péptido del complejo MHC-péptido es un epítipo de antígeno capaz de unirse al MHC, tal como un antígeno tumoral, por ejemplo, un antígeno tumoral universal, un antígeno de mieloma u otro antígeno, como se describe más adelante. En algunos casos, después se administra una cantidad eficaz del inmunógeno a un hospedador para suscitar una respuesta inmunitaria, en donde el inmunógeno conserva una forma tridimensional del mismo durante un periodo de tiempo suficiente para suscitar una respuesta inmunitaria contra la presentación tridimensional del péptido en el surco de unión de la molécula del MHC. A continuación, se analiza el suero recogido del hospedador para determinar si se están produciendo los anticuerpos deseados que reconocen una presentación tridimensional del péptido en el surco de unión de la molécula del MHC. En algunos casos, los anticuerpos producidos pueden analizarse para confirmar que el anticuerpo puede diferenciar el complejo MHC-péptido de la molécula del MHC en solitario, el péptido de interés en solitario y un complejo de MHC y péptido irrelevante. A continuación, los anticuerpos deseados pueden aislarse.

En algunos casos, puede producirse un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo, que se una específicamente a un complejo MHC-péptido empleando métodos de presentación de bibliotecas de anticuerpos, tales como bibliotecas fagotecas de anticuerpos. En algunos casos, pueden generarse fagotecas de presentación de Fab, scFv u otras formas de anticuerpos mutantes, por ejemplo, en la que los miembros de la biblioteca están mutados en uno o más restos de una o varias CDR. Véanse, p. ej., las solicitudes de EE. UU. publicadas con N.º US20020150914, US2014/0294841; y Cohen C.J. *et al.* (2003) J Mol. Recog. 16:324-332.

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

En algunos casos, las proteínas de unión a antígeno, los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, reconocen específicamente un antígeno de un anticuerpo de longitud completa. En algunos casos, las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo pueden ser de longitud completa o pueden ser una porción de unión a antígeno (un Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv o un Fv monocatenario (scFv)). En otros casos, la región constante de cadena pesada del anticuerpo se elige, p. ej., entre IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD e IgE, particularmente se elige, p.

ej., entre IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, más particularmente, IgG1 (p. ej., IgG1 humana). En otro caso, la región constante de cadena ligera del anticuerpo se elige, p. ej., entre kappa o lambda, particularmente kappa.

Entre los anticuerpos desvelados se encuentran fragmentos de anticuerpos. Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo inalterado que comprende una porción de un anticuerpo inalterado que se une al antígeno al que se une el anticuerpo inalterado. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, diacuerpos; anticuerpos lineales; regiones de cadena pesada variable (V<sub>H</sub>), moléculas de anticuerpos monocatenarios tales como scFv y anticuerpos sencillos de un solo dominio V<sub>H</sub>; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. En casos particulares, los anticuerpos son fragmentos de anticuerpos monocatenarios que comprenden una región de cadena pesada variable y/o una región de cadena ligera variable, tal como los scFv.

La expresión "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que está implicada en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera (V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>, respectivamente) de un anticuerpo natural tienen generalmente estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones estructurales (FR) conservadas y tres CDR. (Véase, p. ej., Kindt *et al.* Kuby Immunology, 6ª ed., W. H. Freeman y Co., página 91 (2007). Un solo dominio V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub> puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Adicionalmente, para explorar una biblioteca de dominios V<sub>L</sub> o V<sub>H</sub> complementarios, pueden aislarse anticuerpos que se unan a un antígeno particular usando un dominio V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub> de un anticuerpo que se una al antígeno, respectivamente. Véase, p. ej., Portolano *et al.*, J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson *et al.*, Nature 352:624-628 (1991).

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

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

Un anticuerpo "humanizado" es un anticuerpo en el que todos o sustancialmente todos los restos de aminoácidos de la CDR provienen de CDR no humanas y todos o sustancialmente todos los restos de aminoácidos de la FR provienen de FR humanas. Un anticuerpo humanizado puede incluir opcionalmente al menos una porción de una región constante de anticuerpo que proviene de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo no humano, se refiere a una variante del anticuerpo no humano que se ha humanizado, normalmente para reducir la inmunogenicidad en seres humanos, a la vez que se conserva la especificidad y la afinidad del anticuerpo no humano precursor. En algunos casos, se sustituyen algunos restos de FR en un anticuerpo humanizado por restos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que proceden los restos de CDR), p. ej., para restablecer o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

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

En algunos casos, el receptor recombinante tal como el CAR, tal como la porción de anticuerpo del mismo, además incluye un espaciador, que puede ser o incluir al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina o una variante o versión modificada de la misma, tal como una región de bisagra, p. ej., una región de bisagra de IgG4 y/o una región C<sub>H</sub>1/C<sub>L</sub> y/o Fc. En algunos casos, el receptor recombinante comprende además un espaciador y/o una región bisagra. En algunos casos, la región o porción constante es de una IgG humana, tal como IgG4 o IgG1. En algunos aspectos, la porción de la región constante sirve como una región espaciadora entre el componente de reconocimiento de antígeno, p. ej., scFv y dominio transmembrana. El espaciador puede tener una longitud que proporcione una mayor capacidad de respuesta de la célula después de la unión del antígeno, en comparación con

en ausencia del espaciador. En algunos ejemplos, el espaciador tiene o tiene aproximadamente una longitud de 12 aminoácidos o tiene una longitud inferior a 12 aminoácidos. Los espaciadores ilustrativos incluyen los que tienen al menos aproximadamente de 10 a 229 aminoácidos, aproximadamente de 10 a 200 aminoácidos, aproximadamente de 10 a 175 aminoácidos, aproximadamente de 10 a 150 aminoácidos, aproximadamente de 10 a 125 aminoácidos, aproximadamente de 10 a 100 aminoácidos, aproximadamente de 10 a 75 aminoácidos, aproximadamente de 10 a 50 aminoácidos, aproximadamente de 10 a 40 aminoácidos, aproximadamente de 10 a 30 aminoácidos, aproximadamente de 10 a 20 aminoácidos o aproximadamente de 10 a 15 aminoácidos e incluyen cualquier número entero entre los extremos de cualquiera de los intervalos enumerados. En algunos casos, una región espaciadora tiene aproximadamente 12 aminoácidos o menos, aproximadamente 119 aminoácidos o menos, o aproximadamente 229 aminoácidos o menos. Los espaciadores ilustrativos incluyen solo la bisagra de IgG4, la bisagra de IgG4 unida a los dominios CH2 y CH3 o la bisagra de IgG4 unida al dominio CH3. Los espaciadores ilustrativos incluyen, pero sin limitación, los descritos en Hudecek *et al.* (2013) Clin. Cancer Res., 19:3153 o en la publicación de solicitud de patente internacional número WO2014031687. En algunos casos, el espaciador tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1, y está codificado por la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2. En algunos casos, el espaciador tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 3. En algunos casos, el espaciador tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 4.

En algunos casos, la región o porción constante es de IgD. En algunos casos, el espaciador tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 5. En algunos casos, 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 y 5. En algunos casos, el espaciador tiene la secuencia expuesta en las SEQ ID NO: 23-31. En algunos casos, 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: 27-31, 58, 59.

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

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

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

El receptor, p. ej., el CAR, generalmente incluye al menos un componente o componentes de señalización intracelular. En algunos casos, el receptor incluye un componente intracelular de un complejo TCR, tal como una cadena de CD3 del TCR que actúa como mediadora en la activación y citotoxicidad de los linfocitos T, p. ej., la cadena zeta de CD3. Por tanto, en algunos aspectos, el anticuerpo de unión a ROR1 está unido a uno o más módulos de señalización celular. En algunos casos, los módulos de señalización celular incluyen el dominio transmembrana de CD3, los dominios de señalización intracelular de CD3 y/u otros dominios transmembrana de CD. En algunos casos, el receptor, p. ej., CAR, incluye además una porción de una o más moléculas adicionales tales como el receptor  $\gamma$  de Fc, CD8, CD4, CD25 o CD16. Por ejemplo, en algunos aspectos, el CAR incluye una molécula quimérica entre CD3-zeta (CD3- $\zeta$ ) o el receptor  $\gamma$  de Fc y CD8, CD4, CD25 o CD16.

En algunos casos, tras el ligamiento del CAR, el dominio citoplásmico o la región de señalización intracelular del CAR activa al menos una de las funciones o respuestas efectoras normales de la célula inmunitaria, p. ej., un linfocito T genomodificado para expresar el CAR. Por ejemplo, en algunos contextos, el CAR induce una función de un linfocito T, tal como actividad citolítica o actividad auxiliar de linfocitos T, tal como la secreción de citocinas u otros factores. En

algunos casos, se usa una porción truncada de una región de señalización intracelular de un componente receptor de antígeno o molécula coestimuladora en lugar de una cadena inmunoestimuladora inalterada, por ejemplo, si transduce la señal de función efectora. En algunos casos, las regiones de señalización intracelular, p. ej., que comprenden un dominio o dominios intracelulares, incluyen las secuencias citoplásmicas del receptor de linfocitos T (TCR) y, en algunos aspectos, también las de los correceptores que, en el contexto natural, actúan en sintonía con dicho receptor para iniciar la transducción de señales después de la interacción del receptor del antígeno, y/o cualquier derivado o variante de dichas moléculas, y/o cualquier secuencia sintética que tenga la misma capacidad funcional.

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

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

En algunos aspectos, el CAR incluye una secuencia de señalización citoplásmica primaria que regula la activación primaria del complejo TCR. Las secuencias de señalización citoplásmicas primarias que actúan de manera estimulante pueden contener motivos de señalización que se conocen como motivos de activación inmunoceptores basados en tirosina o ITAM. Ejemplos de ITAM que contienen secuencias de señalización citoplásmicas primarias incluyen las procedentes de TCR o CD3 zeta, FcR gamma o FcR beta. En algunos casos, la(s) molécula(s) de señalización citoplasmática en el CAR contiene(n) un dominio de señalización citoplásmica, una porción del mismo, o una secuencia procedente de CD3 zeta.

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

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

En determinados casos, la región de señalización intracelular comprende un dominio transmembrana de CD28 y un dominio de señalización unido a un dominio intracelular de CD3 (p. ej., CD3-zeta). En algunos casos, la región de señalización intracelular comprende dominios coestimuladores CD28 y CD137 (4-1BB, TNFRSF9) quiméricos, unidos a un dominio intracelular CD3 zeta.

En algunos casos, el CAR abarca uno o más, p. ej., dos o más, dominios coestimuladores y un dominio de activación, p. ej., un dominio de activación primario, en la porción citoplásmica. Los CAR ilustrativos incluyen componentes intracelulares de CD3-zeta, CD28 y 4-1BB.

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

En algunos casos, el receptor quimérico para el antígeno incluye una porción extracelular que contiene el anticuerpo o fragmento descrito en el presente documento. En algunos aspectos, el receptor quimérico para el antígeno incluye una porción extracelular que contiene el anticuerpo o fragmento descrito en el presente documento y un dominio de señalización intracelular. En algunos casos, el anticuerpo o fragmento incluye un scFv o un anticuerpo de un solo dominio V<sub>H</sub> y el dominio intracelular contiene un ITAM. En algunos aspectos, el dominio de señalización intracelular incluye un dominio de señalización de una cadena zeta de una cadena CD3-zeta (CD3ζ). En algunos casos, el receptor quimérico para el antígeno incluye un dominio transmembrana dispuesto entre el dominio extracelular y la región de señalización intracelular.

En algunos aspectos, el dominio transmembrana contiene una porción transmembrana de CD28. El dominio extracelular y el transmembrana pueden unirse directa o indirectamente. En algunos casos, el dominio extracelular y el transmembrana están unidos por un espaciador, tal como cualquiera de los descritos en el presente documento. En algunos casos, el receptor quimérico para el antígeno contiene un dominio intracelular de una molécula coestimuladora



de linfocitos T, tal como entre el dominio transmembrana y el dominio de señalización intracelular. En algunos aspectos, la molécula coestimuladora de linfocitos T es CD28 o 4-1BB.

- En algunos casos, el CAR contiene un anticuerpo, p. ej., un fragmento de anticuerpo, un dominio transmembrana que es o contiene una porción transmembrana de CD28 o una variante funcional del mismo, y un dominio de señalización intracelular que contiene una porción de señalización de CD28 o una variante funcional del mismo y una porción de señalización de CD3 zeta o una variante funcional del mismo. En algunos casos, el CAR contiene un anticuerpo, p. ej., fragmento de anticuerpo, un dominio transmembrana que es o contiene una porción transmembrana de CD28 o una variante funcional del mismo, y un dominio de señalización intracelular que contiene una porción de señalización de 4-1BB o una variante funcional del mismo y una porción de señalización de CD3 zeta o una variante funcional del mismo. En algunos de dichos casos, 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 solo de bisagra.
- En algunos casos, el dominio transmembrana del receptor, p. ej., el CAR es un dominio transmembrana de CD28 humano o una variante del mismo, p. ej., un dominio transmembrana de 27 aminoácidos de un CD28 humano (n.º de registro: P10747.1), o es 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, la porción que contiene el 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 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, el receptor quimérico para el antígeno contiene un dominio intracelular de una molécula coestimuladora de linfocitos T. En algunos aspectos, la molécula coestimuladora de linfocitos T es CD28 o 4-1BB.
- En algunos casos, la región de señalización intracelular comprende un dominio de señalización coestimulador intracelular de CD28 humano o una variante funcional o parte del mismo, tal como un dominio de 41 aminoácidos del mismo y/o tal dominio con una sustitución de LL a GG en las posiciones 186-187 de una proteína CD28 natural. En algunos casos, 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 presente al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10 u 11. En algunos casos, la región intracelular comprende un dominio de señalización coestimulador intracelular de 4-1BB o una variante funcional o parte del mismo, tal como un dominio citoplasmático de 42 aminoácidos de un 4-1BB humano (n.º de registro Q07011.1) o una variante funcional o una parte del mismo, tal como la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 12 o una secuencia de aminoácidos que presente al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 12.
- En algunos casos, la región de señalización intracelular comprende una cadena CD3 humana, opcionalmente un dominio de señalización estimulador de CD3 zeta o una variante funcional del mismo, tal como un dominio citoplasmático de 112 AA de la isoforma 3 de CD3ζ humano (n.º de registro: P20963.2) o un dominio de señalización de CD3 zeta tal como se describe en la patente de EE. UU. N.º: 7.446.190 o en la patente de Estados Unidos N.º 8.911.993. En algunos casos, la región de señalización intracelular comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 13, 14 o 15 o una secuencia de aminoácidos que presente al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 13, 14 o 15.
- En algunos aspectos, el espaciador contiene solo una región de bisagra de una IgG, tal como solo una bisagra de IgG4 o IgG1, tal como solo el espaciador de bisagra expuesto en la SEQ ID NO:1. En otros casos, el espaciador es una bisagra de Ig, p. ej., y una bisagra de IgG4, unido a los dominios C<sub>H</sub>2 y/o C<sub>H</sub>3. En algunos casos, el espaciador es una bisagra de Ig, p. ej., una bisagra de IgG4, unida a los dominios C<sub>H</sub>2 y C<sub>H</sub>3, tal como se expone en la SEQ ID NO:3. En algunos casos, el espaciador es una bisagra de Ig, p. ej., una bisagra de IgG4, unido únicamente a un dominio C<sub>H</sub>3, tal como se expone en la SEQ ID NO:4. En algunos casos, el espaciador es o comprende una secuencia rica en glicina-serina u otro enlazador flexible tal como los enlazadores flexibles conocidos.

## **2. Receptores quiméricos de autoanticuerpos (CAAR)**

- En algunos casos, entre el receptor recombinante expresado por las células genomodificadas utilizadas en relación con los métodos, usos, artículos de fabricación y composiciones desvelados, se encuentra un receptor quimérico de autoanticuerpos (CAAR, *chimeric autoantibody receptor*). En algunos casos, el CAAR es específico para un autoanticuerpo. En algunos casos, una célula que exprese el CAAR, tal como un linfocito T genomodificado para expresar un CAAR, puede utilizarse para unirse específicamente a células que expresan autoanticuerpos y destruirlas, pero no a células normales que expresan anticuerpos. En algunos casos, las células que expresan CAAR pueden utilizarse para tratar una enfermedad autoinmunitaria asociada a la expresión de autoantígenos, tales como

enfermedades autoinmunitarias. En algunos casos, las células que expresan CAAR pueden dirigirse a los linfocitos B que, en última instancia, producen los autoanticuerpos y los presentan en su superficie celular, marcando estos linfocitos B como dianas específicas de la enfermedad para una intervención terapéutica. En algunos casos, las células que expresan CAAR pueden utilizarse para dirigirse a, y eliminar eficazmente, los linfocitos B patógenos en enfermedades autoinmunitarias, dirigiéndose a los linfocitos B causantes de la enfermedad usando un receptor quimérico de autoanticuerpos específico de antígeno. En algunos casos, el receptor recombinante es un CAAR, tal como se describe en la pub. de solicitud de patente de EE.UU. N.º US 2017/0051035.

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

En algunos casos, el dominio de unión a autoanticuerpos 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 un cuadro clínico particular, p. ej. una enfermedad autoinmunitaria, tal como una enfermedad autoinmunitaria mediada por autoanticuerpos. En algunos casos, la enfermedad autoinmunitaria incluye pénfigo vulgar (PV). Como autoantígenos ilustrativos se incluyen desmogleína 1 (Dsg1) y Dsg3.

### 3. Direccionamiento múltiple

En algunos casos, las células utilizadas en relación con los métodos, usos, artículos de fabricación y composiciones desvelados incluyen células que emplean estrategias de direccionamiento múltiple. En algunos casos, las células expresan receptores quiméricos para el antígeno (CAR) multicable o expresan dos o más receptores genomodificados en la célula, reconociendo cada uno de ellos un antígeno diferente y normalmente incluyendo cada uno de ellos un componente de señalización intracelular diferente. Dichas estrategias de direccionamiento múltiple se describen, por ejemplo, en la Solicitud de Patente Internacional, N.º de publicación: WO 2014055668 A1 (que describe combinaciones de CAR activadores y coestimuladores, p. ej., que se dirigen a dos antígenos diferentes presentes individualmente en células distintas de la diana, p. ej., células normales, pero presentes conjuntamente solo en las células de la enfermedad o afección a tratar) y en Fedorov *et al.*, Sci. Transl. Medicine, 5(215) (diciembre de 2013) (que describen células que expresan un CAR activador e inhibidor, tales como aquellas en las que el CAR activador se une a un antígeno expresado tanto en células normales como no enfermas y en células de la enfermedad o afección a tratar, y el CAR inhibidor se une a otro antígeno expresado solo en las células normales o células que no se desea tratar).

Por ejemplo, en algunos casos, las células incluyen un receptor que expresa un primer receptor de antígeno genomodificado (p. ej., CAR o TCR) que es capaz de inducir una señal activadora o estimuladora en la célula, generalmente tras la unión específica al antígeno reconocido por el primer receptor, p. ej., el primer antígeno. En algunos casos, la célula incluye además un segundo receptor de antígeno genomodificado (p. ej., CAR o TCR), p. ej., un receptor coestimulador quimérico, que es capaz de inducir una señal coestimuladora en la célula inmunitaria, generalmente tras la unión específica a un segundo antígeno reconocido por el segundo receptor. En algunos casos, el primer antígeno y el segundo antígeno son el mismo. En algunos casos, el primer antígeno y el segundo antígeno son diferentes.

En algunos casos, el primer y/o segundo receptor de antígeno genomodificado (p. ej. CAR o TCR) es capaz de inducir una señal activadora en la célula. En algunos casos, el receptor incluye un componente de señalización intracelular que contiene ITAM o motivos similares a ITAM. En algunos casos, la activación inducida por el primer receptor implica una transducción de señales o un cambio en la expresión de proteínas en la célula, dando como resultado al inicio de una respuesta inmunitaria, tal como la fosforilación de ITAM y/o al inicio de la cascada de transducción de señales mediada por ITAM, a la formación de una sinapsis inmunológica y/o al agrupamiento de moléculas cerca del receptor unido (p. ej. CD4 o CD8, etc.), a la activación de uno o más factores de transcripción, tales como NF-κB y/o AP-1, y/o a la inducción de la expresión génica de factores tales como citocinas, a la proliferación y/o supervivencia.

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

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

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

En algunos casos, ni el ligamiento del primer receptor solo ni el ligamiento del segundo receptor solo inducen una respuesta inmunitaria sólida. En algunos aspectos, si sólo se liga un receptor, la célula se toleriza o no responde al antígeno, o se inhibe, y/o no es inducida a proliferar o a secretar factores o a llevar a cabo funciones efectoras. Sin embargo, en algunos de estos casos, cuando se liga la pluralidad de receptores, tal como al encontrarse con una célula que exprese el primer y segundo antígeno, se consigue la respuesta deseada, tal como la activación o estimulación inmunitaria completa, p. ej., como indica la secreción de una o más citocinas, la proliferación, persistencia, y/o llevar a cabo una función efectora inmunitaria tal como la destrucción citotóxica de una célula diana.

En algunos casos, los dos receptores inducen, respectivamente, una señal activadora y otra inhibidora en la célula, de tal manera que la unión de uno de los receptores a su antígeno active la célula o induzca una respuesta, pero la unión del segundo receptor inhibidor a su antígeno induce una señal que suprime o amortigua esa respuesta. Algunos ejemplos son las combinaciones de CAR activadores y CAR inhibidores o iCAR. Dicha estrategia puede utilizarse, por ejemplo, cuando el CAR activador se une a un antígeno expresado en una célula de la enfermedad o afección pero que también se expresa en células normales, y el receptor inhibidor se une a un antígeno distinto que se expresa en las células normales pero no en las células de la enfermedad o afección.

En algunos casos, la estrategia de direccionamiento múltiple se emplea en un caso donde un antígeno asociado a una enfermedad o afección particular se expresa en una célula no enferma y/o se expresa en la propia célula genomodificada, ya sea de forma transitoria (p. ej., en caso de estimulación asociada a genomodificación) o permanente. En dichos casos, al requerir el ligamiento de dos receptores de antígenos distintos e individualmente específicos, la especificidad, selectividad y/o eficacia, pueden mejorarse.

En algunos casos, la pluralidad de antígenos, p. ej., el primer y segundo antígenos, se expresan en la célula, en el tejido o en enfermedad o afección que se pretende combatir, tal como en la célula cancerosa. En algunos aspectos, la célula, el tejido, la enfermedad o afección es mieloma múltiple o una célula de mieloma múltiple. En algunos casos, uno o más de la pluralidad de antígenos generalmente también se expresa en una célula a la que no se desea dirigir la terapia celular, tal como una célula o tejido normal o no enfermo, y/o las propias células genomodificadas. En dichos casos, al requerir el ligamiento de múltiples receptores para lograr una respuesta de la célula, se consigue especificidad y/o eficacia.

#### **4. Receptores de linfocitos T**

En algunos casos, se desvelan células genomodificadas, tales como linfocitos T, que expresan un receptor de linfocitos T (TCR) o una porción de unión a antígeno del mismo, que reconocen un epítipo peptídico o un epítipo de linfocitos T de un polipéptido diana, tal como un antígeno de un tumor, proteína vírica o autoinmunitaria.

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

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

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

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

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

En algunos casos, las cadenas de TCR contienen un dominio transmembrana. En algunos casos, el dominio transmembrana está cargado positivamente. En algunos casos, las cadenas de TCR contienen una cola citoplasmática. En algunos casos, la estructura permite que el TCR se asocie a otras moléculas como CD3 y subunidades de la misma. Por ejemplo, un TCR que contiene dominios constantes con una región transmembrana puede anclar la proteína en la membrana celular y asociarse a subunidades invariantes del aparato o complejo de señalización de CD3. Las colas intracelulares de las subunidades de señalización de CD3 (p. ej., cadenas CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$  y CD3 $\zeta$ ) contienen uno o más motivos de activación inmunorreceptores basados en tirosina o ITAM que intervienen en la capacidad de señalización del complejo TCR.

En algunos casos, el TCR puede ser un heterodímero de dos cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  (u opcionalmente  $\gamma$  y  $\delta$ ) o puede ser una construcción de TCR de cadena sencilla. En algunos casos, el TCR es un heterodímero que contiene dos cadenas distintas (cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  o cadenas  $\gamma$  y  $\delta$ ) que están unidas, tal como por un enlace disulfuro o enlaces disulfuro.

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

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

- En algunos casos, el TCR se genera a partir de un TCR identificado o seleccionado a partir de la exploración de una biblioteca de TCR candidatos contra un antígeno polipéptido diana, o un epítipo de linfocitos T diana del mismo. Las bibliotecas de TCR pueden generarse mediante la amplificación del repertorio de V $\alpha$  y V $\beta$  de linfocitos T aislados de un sujeto, incluidas las células presentes en las CMSP, bazo u otro órgano linfoide. En algunos casos, los linfocitos T pueden amplificarse a partir de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL, *tumor-infiltrating lymphocytes*). En algunos casos, las bibliotecas de TCR pueden generarse a partir de células CD4+ o CD8+. En algunos casos, 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, 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, se utilizan cebadores degenerados para amplificar el repertorio de genes de V $\alpha$  y V $\beta$ , tal como mediante RT-PCR en muestras, tales como linfocitos T, obtenidas de seres humanos. En algunos casos, las bibliotecas scTv pueden ensamblarse a partir de bibliotecas V $\alpha$  y V $\beta$  indiferenciadas en las que los productos amplificados se clonan o ensamblan para ser separados por un enlazador. Dependiendo de la fuente del sujeto y de las células, las bibliotecas pueden ser específicas para el alelo del HLA (antígeno leucocitario humano). De manera alternativa, en algunos casos, pueden generarse bibliotecas de TCR mediante mutagénesis o diversificación de una molécula de TCR precursora o estructural. En algunos aspectos, los TCR se someten a evolución dirigida, tal como mediante mutagénesis, p. ej., de la cadena  $\alpha$  o  $\beta$ . En algunos aspectos, se alteran restos particulares dentro de las CDR del TCR. En algunos casos, los TCR seleccionados pueden modificarse mediante maduración por afinidad. En algunos casos, pueden seleccionarse linfocitos T específicos de antígeno, tal como mediante exploración para evaluar la actividad de los CTL (*Cytotoxic T lymphocytes*, linfocitos T citotóxicos) contra el péptido. En algunos aspectos, los TCR, p. ej., presentes en los linfocitos T específicos de antígeno, pueden seleccionarse, tal como mediante actividad de unión, p. ej., afinidad o avidéz particular por el antígeno.
- En algunos casos, el TCR o la porción de unión a antígeno del mismo es uno que se ha modificado o genomodificado. En algunos casos, los métodos de evolución dirigida se utilizan para generar TCR con propiedades alteradas, tal como mayor afinidad por un complejo MHC-péptido específico. En algunos casos, la evolución dirigida se consigue mediante métodos de presentación que incluyen, pero sin limitación, presentación en levaduras (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, los enfoques de presentación implican genomodificación, o modificación, de un TCR conocido, precursor o de referencia. Por ejemplo, en algunos casos, como molde, puede utilizarse un TCR natural (*wild-type*), para producir TCR mutagenizados en los que uno o más restos de las CDR están mutados, y se seleccionaran mutantes con una propiedad alterada deseada, tal como una mayor afinidad por un antígeno diana deseado.
- En algunos casos, se conocen o pueden identificarse fácilmente péptidos de un polipéptido diana para su uso en la producción o generación de un TCR de interés. En algunos casos, los péptidos adecuados para su uso en la generación de los TCR o porciones de unión a antígeno pueden determinarse basándose en la presencia de un motivo restringido al HLA en un polipéptido diana de interés, tal como un polipéptido diana descrito más adelante. En algunos casos, los péptidos se identifican utilizando los modelos informáticos de predicción disponibles. En algunos casos, para predecir los sitios de unión del MHC de clase I, dichos modelos incluyen, pero sin limitación, ProPred1 (Singh and Raghava (2001) *Bioinformatics* 17(12): 1236-1237 y SYFPEITHI (véase Schuler *et al.* (2007) *Immunoinformatics Methods in Molecular Biology*, 409(1): 75-93 2007). En algunos casos, el epítipo restringido al MHC es HLA-A0201, que se expresa en aproximadamente un 39-46 % de todos los caucásicos y, por tanto, representa una elección adecuada de antígeno del MHC para su uso en la preparación de un TCR u otra molécula de unión al péptido MHC.
- pueden utilizarse motivos de unión a HLA-A0201 y los sitios de escisión de proteasomas e inmunoproteasomas utilizando modelos de predicción informáticos. Para predecir los sitios de unión del MHC de clase I, dichos modelos incluyen, pero sin limitación, ProPred1 (descrito con más detalle en Singh y Raghava, ProPred: predicción de sitios de unión HLA-DR. *BIOINFORMATICS* 17(12):1236-1237 2001) y SYFPEITHI (véase Schuler *et al.* SYFPEITHI, Database for Searching and T-Cell Epitope Prediction. en *Immunoinformatics Methods in Molecular Biology*, vol 409(1): 75-93 2007)
- En algunos casos, el TCR o la porción de unión a antígeno del mismo puede ser una proteína natural producida de manera recombinante o una forma mutada de la misma en la que una o más propiedades, tal como una característica de unión, se ha alterado. En algunos casos, un TCR puede proceder de una de varias especies animales, tal como un ser humano, ratón, rata u otro mamífero. Un TCR puede estar unido a células o en forma soluble. En algunos casos, para los propósitos de los métodos desvelados, el TCR está unido a una célula y se expresa en la superficie de la misma.
- En algunos casos, el TCR es un TCR de longitud completa. En algunos casos, el TCR es una porción de unión a antígeno. En algunos casos, el TCR es un TCR dimérico (dTTCR, *dimeric TCR*). En algunos casos, el TCR es un TCR monocatenario (sc-TCR, *single-chain TCR*). En algunos casos, un dTCR o un scTCR tiene las estructuras descritas en los documentos WO 03/020763, WO 04/033685, WO 2011/044186.
- En algunos casos, el TCR contiene una secuencia correspondiente a la secuencia transmembrana. En algunos casos, el TCR contiene una secuencia correspondiente a secuencias citoplasmáticas. En algunos casos, el TCR es capaz de

formar un complejo TCR con CD3. En algunos casos, cualquiera de los TCR, incluyendo un dTCR o un scTCR, pueden ligarse a dominios de señalización que dan lugar a un TCR activo en la superficie de un linfocito T. En algunos casos, el TCR se expresa en la superficie de las células.

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

- En algunos casos, un dTCR contiene una cadena  $\alpha$  del TCR con que contiene un dominio  $\alpha$  variable, un dominio  $\alpha$  constante y un primer motivo de dimerización unido al extremo C del dominio  $\alpha$  constante, y una cadena  $\beta$  del TCR que comprende un dominio  $\beta$  variable, un dominio  $\beta$  constante y un primer motivo de dimerización unido al extremo C  
20 del dominio  $\beta$  constante, en donde el primer y el segundo motivos de dimerización interaccionan fácilmente para formar un enlace covalente entre un aminoácido del primer motivo de dimerización y un aminoácido del segundo motivo de dimerización que une la cadena  $\alpha$  del TCR y la cadena  $\beta$  del TCR.

- En algunos casos, el TCR es un scTCR. Normalmente, un scTCR puede generarse utilizando métodos conocidos por  
25 los expertos en la materia, Véanse, p. ej., Soo Hoo, W. F. *et al.* PNAS (USA) 89, 4759 (1992); Wülfing, C. y Plücker, A., J. Mol. Biol. 242, 655 (1994); Kurucz, I. *et al.* PNAS (USA) 90 3830 (1993); las PCT internacionales publicadas n.º WO 96/13593, WO 96/18105, WO99/60120, WO99/18129, WO 03/020763, WO2011/044186; y Schlueter, C. J. *et al.* J. Mol. Biol. 256, 859 (1996). En algunos casos, un scTCR contiene un enlace disulfuro intercatenario no natural introducido para facilitar la asociación de las cadenas del TCR (véase, p. ej., la publicación internacional PCT n.º WO  
30 03/020763). En algunos casos, un scTCR es un TCR truncado no unido por disulfuro en el que cremalleras de leucina heterólogas fusionadas a los extremos C de las mismas facilitan la asociación de cadenas (véase, p. ej., la publicación internacional PCT n.º WO99/60120). En algunos casos, un scTCR contiene un dominio variable TCR $\alpha$  unido de manera covalente a un dominio variable TCR $\beta$  mediante un enlazador peptídico (véase, p. ej., la publicación internacional PCT n.º WO99/18129).

- 35 En algunos casos, un scTCR comprende un primer segmento constituido por una secuencia de aminoácidos correspondiente a una región variable de la cadena  $\alpha$  de TCR, un segundo segmento constituido por una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia de la región variable de la cadena  $\beta$  de TCR fusionada al extremo N de una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena  
40  $\beta$  de TCR, y una secuencia enlazadora que une el extremo C del primer segmento al extremo N del segundo segmento.

- En algunos casos, un scTCR contiene un primer segmento constituido por una secuencia de región variable de cadena  $\alpha$  fusionada al extremo N de una secuencia de dominio constante extracelular de cadena  $\alpha$ , y un segundo segmento constituido por una secuencia de región variable de cadena  $\beta$  fusionada al extremo N de una secuencia constante  
45 extracelular de cadena  $\beta$  y una secuencia transmembrana, y, opcionalmente, una secuencia enlazadora que une el extremo C del primer segmento con el extremo N del segundo segmento.

- En algunos casos, un scTCR contiene un primer segmento constituido por una secuencia de región variable de cadena  $\beta$  del TCR fusionada al extremo N de una secuencia de dominio constante extracelular de cadena  $\beta$ , y un segundo  
50 segmento constituido por una secuencia de región variable de cadena  $\alpha$  fusionada al extremo N de una secuencia constante extracelular de cadena  $\alpha$  y una secuencia transmembrana, y, opcionalmente, una secuencia enlazadora que une el extremo C del primer segmento con el extremo N del segundo segmento.

- En algunos casos, el enlazador de un scTCR que une el primer y segundo segmentos del TCR puede ser cualquier  
55 enlazador capaz de formar una única cadena polipeptídica, conservando al mismo tiempo la especificidad de unión al TCR. En algunos casos, la secuencia enlazadora puede, por ejemplo, tener la fórmula -P-AA-P- en donde P es prolina y AA representa una secuencia de aminoácidos en donde los aminoácidos son glicina y serina. En algunos casos, el primer y segundo segmentos están emparejados de tal manera que las secuencias de región variable de la misma están orientadas para dicha unión. Por consiguiente, en algunos casos, el enlazador tiene una longitud que es  
60 suficiente para abarcar la distancia entre el extremo C del primer segmento y el extremo N del segundo segmento, o viceversa, pero que no es tan larga como para bloquear o reducir la unión del scTCR al ligando diana. En algunos casos, el enlazador puede contener de, 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, el enlazador tiene la fórmula -PGGG-(SGGGG)5-P- en donde P es prolina, G es glicina y S es serina (SEQ ID NO: 23). En algunos casos,  
65 el enlazador tiene la secuencia GSADDAKKDAKKDKGS (SEQ ID NO: 24).

En algunos casos, el scTCR contiene un enlace disulfuro covalente que une un resto de la región de inmunoglobulina del dominio constante de la cadena  $\alpha$  con un resto de la región de inmunoglobulina del dominio constante de la cadena  $\beta$ . En algunos casos, en un TCR natural no hay enlaces disulfuro intercatenarios. Por ejemplo, en algunos casos, una o más cisteínas pueden incorporarse a las secuencias extracelulares de la región constante del primer y segundo segmentos del polipéptido scTCR. En algunos casos, puede ser deseable tanto un enlace disulfuro natural como uno no natural.

En algunos casos de un dTCR o scTCR que contiene enlaces disulfuro intercatenarios introducidos, no hay enlaces disulfuro naturales. En algunos casos, la una o más de las cisteínas naturales que forman un enlace disulfuro intercatenario natural se sustituye(n) por otro resto, tal como a una serina o alanina. En algunos casos, mutando restos que no son cisteína en el primer y segundo segmentos por cisteína, puede formarse un enlace disulfuro introducido. En la publicación internacional PCT n.º WO2006/000830 se describen enlaces disulfuro no naturales ilustrativos de un TCR.

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

En algunos casos, el ácido nucleico o los ácidos nucleicos que codifica(n) un TCR, tal como las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ , pueden amplificarse mediante PCR, clonación u otros medios adecuados y clonarse en un vector o vectores de expresión adecuado(s). El vector de expresión puede ser cualquier vector de expresión recombinante adecuado, y puede utilizarse para transformar o transfectar cualquier hospedador adecuado. Como vectores adecuados se incluyen los que están diseñados para la propagación y ampliación o para la expresión o ambas cosas, tales como plásmidos y virus.

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

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

En algunos casos, para generar un vector que codifique un TCR, las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  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, las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  se clonan en el mismo vector. En algunos casos, las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  se clonan en vectores diferentes. En algunos casos, las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  generadas se incorporan a un vector retrovírico, p. ej., en un vector lentivírico.

## B. Ácidos nucleicos y vectores

También se desvelan uno o más polinucleótidos (p. ej., moléculas de ácido nucleico) que codifican receptores recombinantes, vectores para genomodificar células que expresen los receptores y métodos para producir las células genomodificadas. En algunos aspectos, el receptor recombinante es, o contiene, un receptor quimérico para el antígeno (CAR). En algunos aspectos, el receptor recombinante es o contiene un receptor de linfocitos T (TCR), p. ej., un TCR transgénico.

En algunos casos, la secuencia de ácido nucleico que codifica el receptor recombinante, p. ej., el receptor quimérico para el antígeno (CAR) contiene una secuencia señal que codifica un péptido señal. Como ejemplos no limitativos de péptidos señal se incluyen, por ejemplo, el péptido señal de la cadena alfa de GMCSFR expuesto en la SEQ ID NO: 26 y codificado por la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 25, o el péptido señal alfa de CD8 expuesto en la SEQ ID NO: 18.

En determinados casos en los que las moléculas de ácido nucleico codifican dos o más cadenas polipeptídicas diferentes, cada una de las cadenas polipeptídicas puede estar codificada por una molécula de ácido nucleico distinta.

Por ejemplo, se desvelan dos ácidos nucleicos distintos, y cada uno de ellos puede transferirse o introducirse individualmente en la célula para su expresión en la misma.

En algunos casos, tales como aquellos en los que el polinucleótido contiene una primera y segunda secuencia de ácido nucleico, las secuencias codificantes que codifican cada una de las diferentes cadenas polipeptídicas pueden estar unidas operativamente a un promotor, que puede ser el mismo o diferente. En algunos casos, la molécula de ácido nucleico puede contener un promotor que dirija la expresión de dos o más cadenas polipeptídicas diferentes. En algunos casos, dichas moléculas de ácido nucleico pueden ser multicistónicas (bicistónicas o tricistónicas, véase p. ej., la patente de EE. UU. N.º 6.060.273). En algunos casos, pueden genomodificarse unidades de transcripción como una unidad bicistónica que contenga un IRES (*internal ribosome entry site*, sitio interno de entrada al ribosoma), que permite la coexpresión de productos génicos a través de un mensaje desde un solo promotor. De manera alternativa, en algunos casos, un solo promotor puede dirigir la expresión de un ARN que contenga, en un solo marco abierto de lectura (ORF, *open reading frame*), dos o tres genes separados entre sí por secuencias que codifican un péptido de autoescisión (p. ej., secuencias 2A) o un sitio de reconocimiento de proteasa (p. ej., furina). Por tanto, el ORF codifica un solo polipéptido, que, ya sea durante (en el caso de 2A) o después de la traducción, se procesa en proteínas individuales. En algunos casos, el péptido, tal como un T2A, puede hacer que el ribosoma se salte (salto ribosómico) la síntesis de un enlace peptídico en el extremo C de un elemento 2A, lo que conduce a la separación entre el extremo de la secuencia 2A y el siguiente péptido posterior (véase, por ejemplo, de Felipe. *Genetic Vaccines and Ther.* 2:13 (2004) y de Felipe *et al.* *Traffic* 5:616-626 (2004)). Se conocen varios elementos 2A. Son ejemplos de secuencias 2A que pueden utilizarse en los métodos y el sistema desvelado en el presente documento, sin limitación, las secuencias 2A del virus de la fiebre aftosa (F2A, p. ej., SEQ ID NO: 22), del virus de la rinitis equina A (E2A, p. ej., SEQ ID NO: 21), del virus de la especie *Thosea asigna* (T2A, p. ej., SEQ ID NO: 6 o 17) y del teschovirus-1 porcino (P2A, p. ej., SEQ ID NO: 19 o 20) como se describe en la publicación de patente de EE. UU. N.º 20070116690.

En algunos casos, pueden utilizarse genes marcadores extrínsecos en algunos casos en relación con terapias de genomodificación celular para permitir la detección o selección de células y, en algunos casos, también para promover el suicidio celular. Como ejemplos de marcadores indirectos pueden incluirse formas truncadas de polipéptidos de la superficie celular, tales como formas truncadas que no son funcionales y no transducen o no son capaces de transducir una señal o una señal transducida normalmente por la forma de longitud completa del polipéptido de superficie celular, y/o no se internalizan o no son capaces de internalizarse. Como ejemplos de polipéptidos truncados de la superficie celular se incluyen formas truncadas de factores de crecimiento o de otros receptores, tal como de un receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano truncado (tHER2), un receptor del factor de crecimiento epidérmico truncado (tEGFR, la secuencia ilustrativa de tEGFR se expone en la SEQ ID NO: 7 o 16) o un antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) o una forma modificada del mismo. El tEGFR puede contener un epítipo que reconoce el anticuerpo cetuximab (Erbix®) u otro anticuerpo terapéutico anti-EGFR o molécula de unión, que puede utilizarse para identificar o seleccionar células que se han genomodificado con la construcción tEGFR y una proteína exógena codificada, y/o para eliminar o separar células que expresan la proteína exógena codificada. Véase la patente de Estados Unidos. N.º 8802374 y Liu *et al.*, *Nature Biotech.* Abril de 2016; 34(4): 430-434). En algunos aspectos, el marcador, p. ej., marcador indirecto, incluye todo o parte (p. ej., la forma truncada) de CD34, un NGFR, un CD19 o un CD19 truncado, p. ej., un CD19 no humano truncado, o receptor del factor de crecimiento epidérmico (p. ej., tEGFR).

En algunos casos, el marcador es o comprende una proteína fluorescente, tal como la proteína verde fluorescente (GFP, *green fluorescent protein*), la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP, *enhanced green fluorescent protein*), tal como la GFP superplegada (sfGFP, *super-fold GFP*), la proteína roja fluorescente (RFP, *red fluorescent protein*), tal como tdTomato, mCherry, mStrawberry, AsRed2, DsRed o DsRed2, la proteína fluorescente cian (CFP, *cyan fluorescent protein*), la proteína fluorescente verde azulada (BFP, *blue green fluorescent protein*), la proteína fluorescente azul mejorada (EBFP, *enhanced blue fluorescent protein*) y la proteína fluorescente amarilla (YFP, *yellow fluorescent protein*) así como sus variantes, incluidas las variantes de especies, las variantes monoméricas y la variantes optimizadas y/o mejoradas por codones de las proteínas fluorescentes. En algunos casos, el marcador es o comprende una enzima, tal como una luciferasa, el gen lacZ de *E. coli*, fosfatasa alcalina, fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP, *secreted embryonic alkaline phosphatase*), cloranfenicol acetil transferasa (CAT). Algunos ejemplos de genes indicadores luminosos incluyen luciferasa (luc),  $\beta$ -galactosidasa, cloranfenicol acetiltransferasa (CAT),  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) o sus variantes.

En algunos casos, el marcador es un marcador de selección. En algunos casos, el marcador de selección es o comprende un polipéptido que confiere resistencia a agentes o fármacos exógenos. En algunos casos, el marcador de selección es un gen de resistencia a antibióticos. En algunos casos, el marcador de selección es un gen de resistencia a antibióticos que confiere resistencia a antibióticos a una célula de mamífero. En algunos casos, el marcador de selección es o comprende un gen de resistencia a puromicina, un gen de resistencia a higromicina, 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 a una forma modificada de las mismas.

En algunos casos, el ácido nucleico que codifica el marcador está unido operativamente a un polinucleótido que codifica una secuencia enlazadora, tal como una secuencia enlazadora escindible, p. ej., una T2A. Por ejemplo, un marcador, y opcionalmente, una secuencia enlazadora, puede ser cualquiera de los desvelados en la pub. PCT n.º WO2014031687. Por ejemplo, el marcador puede ser un EGFR truncado (tEGFR), es decir, opcionalmente, unido



a una secuencia enlazadora, tal como una secuencia enlazadora escindible T2A. Un polipéptido ilustrativo de un EGFR truncado (p. ej., 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. En algunos ejemplos, un receptor del factor de crecimiento epidérmico truncado (EGFRt), tal como se expone en las SEQ ID NO: 7 o 16, en algunos casos, puede coexpresarse con un transgén de interés (un CAR o un TCR) en células transducidas (véase, p. ej., la patente de EE. UU. N.º 8.802.374). El EGFRt puede contener un epítipo que reconozca el anticuerpo cetuximab (Erbix®) u otro anticuerpo terapéutico anti-EGFR o molécula de unión, que puede utilizarse para identificar o seleccionar células que se han genomodificado con la construcción 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 Estados Unidos. N.º 8802374 y Liu *et al.*, Nature Biotech. Abril de 2016; 34(4): 430-434.

También se desvelan vectores o construcciones que contienen dichos ácidos nucleicos y/o polinucleótidos. En algunos casos, los vectores o las construcciones contienen uno o más promotores unidos operativamente al ácido nucleico que codifica el receptor recombinante para dirigir su expresión. En algunos casos, el promotor está unido operativamente a una o a más de una molécula de ácido nucleico o polinucleótido. Por tanto, también se desvelan vectores, tales como los que contienen cualquiera de los polinucleótidos desvelados en el presente documento.

En algunos casos, el vector es un vector vírico, tal como un vector retrovírico, p. ej., un vector lentivírico o un vector gammaretrovírico. También se desvelan composiciones que contienen dichos vectores o combinación de vectores. En algunos casos, el conjunto o combinación de vectores, se utiliza conjuntamente para la genomodificación de las células. En algunos casos, para la genomodificación, el primer y segundo vector del conjunto se introducen simultánea o secuencialmente, en cualquier orden, en una célula.

En algunos casos, los vectores incluyen vectores víricos, p. ej., vectores retrovíricos o lentivíricos, no víricos o transposones, p. ej., el sistema de transposón Bella durmiente (*Sleeping Beauty*), vectores procedentes del virus del simio 40 (SV40), adenovirus, dependoparvovirus (AAV, *adeno-associated virus*), vectores lentivíricos o retrovíricos, tales como vectores gammaretrovíricos, un vector retrovírico procedente del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV, *Moloney murine leukemia virus*), virus del sarcoma mieloproliferativo (MPSV, *myeloproliferative sarcoma virus*), virus de células madre embrionarias murinas (MESV, *murine embryonic stem cell virus*), virus de células madre murinas (MSCV, *murine stem cell virus*), virus formador de focos en el bazo (SFFV, *spleen focus forming virus*) o dependoparvovirus (AAV).

### C. Vectores y métodos para la genomodificación

Se conocen bien diversos métodos para la introducción de componentes genomodificados, p. ej., receptores recombinantes, p. ej., los CAR o los TCR. Como métodos ilustrativos se incluyen los de la transferencia de ácidos nucleicos que codifican los receptores, incluyendo la vía vírica, p. ej., retrovírica o lentivírica, transducción, transposones y electroporación. En algunos casos, la expresión de glucanos de superficie se evalúa en una composición de células recogidas antes, durante o inmediatamente después del proceso de genomodificación. En algunos casos, la expresión de glucanos de superficie se evalúa y compara entre composiciones de células en fases correspondientes del proceso para introducir componentes genomodificados. En algunos casos, las composiciones se genomodifican, o se han genomodificado, para expresar el mismo receptor recombinante, pero mediante diferentes métodos de introducción de material genético.

En algunos casos, la transferencia de genes se realiza estimulando primero la célula, tal como combinándolo con un estímulo que induzca una respuesta tal como proliferación, supervivencia y/o activación, p. ej., medida a través de la expresión de una citocina o de un marcador de activación, seguido de la transducción de las células activadas y la ampliación en cultivo hasta cantidades suficientes para aplicaciones clínicas.

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

En algunos casos, el vector retrovírico tiene una secuencia de repetición terminal larga (LTR, *long terminal repeat sequence*), p. ej., un vector retrovírico procedente del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV), virus del sarcoma mieloproliferativo (MPSV), virus de células madre embrionarias murinas (MESV), virus de células madre murinas (MSCV), virus formador de focos en el bazo (SFFV). La mayoría de los vectores retrovíricos proceden de retrovirus murinos. En algunos casos, los retrovirus incluyen los procedentes de cualquier fuente de células de aves o mamíferos. Los retrovirus normalmente son anfitrópicos, lo que significa que son capaces de infectar células hospedadoras de varias especies, incluyendo seres humanos. En un caso, el gen que se va a expresar sustituye el hueco retrovírico, las secuencias pol y/o env. Se han descrito varios sistemas retrovíricos ilustrativos (p. ej., en las

patentes de EE. UU. N.º 5.219.740; 6.207.453; 5.219.740; Miller y Rosman, *BioTechniques*, 7:980-990 (1989); Miller, A. D. *Human Gene Therapy*, 1:5-14 (1990); Scarpa *et al.* *Virology*, 180:849-852 (1991); Burns *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:8033-8037 (1993); y Boris-Lawrie y Temin, *Cur. Opin. Genet. Develop.*, 3:102-109 (1993).

- 5 Se conocen métodos de transducción lentivírica. Los métodos ilustrativos se describe en, p. ej., Wang *et al.*, *J. Immunother.*, 35(9): 689-701 (2012); Cooper *et al.* *Blood*, 101:1637-1644 (2003); Verhoeyen *et al.*, *Methods Mol Biol.*, 506: 97-114 (2009); y Cavalieri *et al.*, *Blood.*, 102(2): 497-505 (2003).

- 10 En algunos casos, los ácidos nucleicos recombinantes se transfieren a los linfocitos T mediante electroporación (véase, p. ej., Chicaybam *et al.*, *PLoS ONE* 8(3): e60298 (2013) y Van Tedeloo *et al.* *Gene Therapy* 7(16): 1431-1437 (2000)). En algunos casos, los ácidos nucleicos recombinantes se transfieren a los linfocitos T mediante transposición (véase, p. ej., Manuri *et al.* *Hum Gene Ther* 21(4): 427-437 (2010); Sharma *et al.* *Molec Ther Nucl Acids* 2, e74 (2013); y Huang *et al.* *Methods Mol Biol* 506: 115-126 (2009)). Otros métodos para introducir y expresar material genético en las células inmunitarias incluyen la transfección con fosfato de calcio (p. ej., 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)).

- 20 Otros enfoques y vectores para la transferencia de los ácidos nucleicos que codifican los productos recombinantes son los descritos, p. ej., en la solicitud de patente internacional, N.º de publicación: WO2014055668 y en la patente de Estados Unidos N.º 7.446.190.

- 25 En algunos casos, las células, p. ej., linfocitos T, pueden transfectarse durante o después de la ampliación, p. ej., con un receptor de linfocitos T (TCR) o un receptor quimérico para el antígeno (CAR). Esta transfección para la introducción del gen del receptor deseado puede realizarse con cualquier vector retroviral adecuado, por ejemplo. La población de células genomodificadas puede entonces liberarse del estímulo inicial (el estímulo CD3/CD28, por ejemplo) y posteriormente estimularse con un segundo tipo de estímulo, p. ej., a través de un receptor introducido de nuevo). Este segundo tipo de estímulo puede incluir un estímulo antigénico en forma de molécula de péptido/MHC, el ligando afín (entrecruzado) del receptor introducido genéticamente (p. ej., el ligando natural de un CAR) o cualquier ligando
- 30 (tal como un anticuerpo) que se una directamente dentro del marco del nuevo receptor (p. ej., mediante el reconocimiento de regiones constantes dentro del receptor). Véase, por ejemplo, Cheadle *et al.*, *Methods Mol Biol.* 907:645-66 (2012); o Barrett *et al.*, *Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer Annual Review of Medicine*, Vol. 65: 333-347 (2014).

- 35 En algunos casos, puede utilizarse un vector que no requiera que las células, p. ej., linfocitos T, se activen. En algunos de dichos casos, las células pueden seleccionarse y/o transducirse antes de la activación. Por tanto, las células pueden genomodificarse antes o después del cultivo de las células y, en algunos casos, al mismo tiempo o durante al menos una parte del cultivo.

- 40 En algunos aspectos, las células también se genomodifican para promover la expresión de citocinas u otros factores. Entre los ácidos nucleicos adicionales, p. ej., los genes de introducción son los que mejoran la eficacia de la terapia, tal como promoviendo la viabilidad y/o función de las células transferidas; genes para proporcionar un marcador genético para la selección y/o evaluación de las células, tales como para evaluar la supervivencia o localización *in vivo*; genes para mejorar la seguridad, por ejemplo, haciendo que la célula sea susceptible a la selección negativa *in vivo* tal como describen 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 obtenidos de la fusión de un marcador seleccionable positivo dominante con un marcador seleccionable negativo. Véase, p. ej., Riddell *et al.*, patente de EE. UU. N.º 6.040.177, en las columnas 14-17.

50

#### D. Características de la composición de salida

- 55 En casos particulares, los métodos desvelados en el presente documento producen o generan una composición de células que contienen células genomodificadas, p. ej., una composición de salida. En determinados casos, una composición de salida es una composición celular resultante de todas o algunas de las etapas de genomodificación celular. En determinados casos, la composición de salida es el resultado de un proceso de genomodificación celular de una composición celular de entrada. En determinados casos, el proceso contiene una o más etapas de activación, transducción o transfección, ampliación y/o recogida de células, tales como células que se obtuvieron de una composición celular de entrada. En determinados casos, la composición celular de salida contiene células que se han genomodificado. En casos particulares, las células de la composición de salida se han sometido a todas las etapas de un proceso de genomodificación.

- 65 En algunos casos, la composición de salida contiene células que incluyen uno o más ácidos nucleicos introducidos mediante genomodificación, y de ese modo expresan productos recombinantes o genomodificados de dichos ácidos nucleicos. En algunos casos, los ácidos nucleicos son heterólogos, es decir, que 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 genomodificando y/o en un organismo del que se obtiene dicha célula. En algunos casos, los ácidos nucleicos no son de origen natural, tal como un ácido nucleico que no se encuentra en la naturaleza, incluyendo uno que comprende combinaciones quiméricas de ácidos nucleicos que codifican diversos dominios de múltiples tipos de células diferentes.

En algunos casos, la composición de salida contiene células que se han genomodificado. En casos particulares, la composición celular de salida contiene linfocitos T genomodificados. En algunos casos, los linfocitos T genomodificados incluyen linfocitos T CD4+ genomodificados y linfocitos T CD8+ genomodificados. En casos particulares, la composición de salida contiene o incluye al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 %, al menos un 99,9 %, o el 100 % o aproximadamente el 100 %, de linfocitos T genomodificados. En determinados casos, las células genomodificadas expresan un receptor recombinante. En casos particulares, la composición de salida contiene o incluye al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 %, al menos un 99,9 %, o el 100 % o aproximadamente el 100 %, de los linfocitos T que expresan un receptor recombinante. En algunos casos, el receptor recombinante es un TCR o un CAR. En casos particulares, el receptor recombinante es un CAR.

### III.COMPOSICIONES Y FORMULACIONES

En el presente documento se desvelan composiciones o formulaciones que contienen células preparadas según los métodos de incubación (p. ej., estimulación) descritos en la presente memoria. En algunos casos, las composiciones y métodos descritos en el presente documento pueden utilizarse para eliminar al menos una parte de poblaciones de células, tales como linfocitos T de tipo no indiferenciado de una población de células. También se desvelan composiciones que comprenden poblaciones de células que ya no contienen células no deseables, o que tienen un número significativamente reducido de células no deseables, en la composición estimulada, tales como células procedentes de linfocitos T de tipo no indiferenciado y usos de las mismas. Las composiciones y métodos desvelados en el presente documento también se utilizan para ampliar selectivamente una población de células que se han eliminado con respecto a subpoblaciones no deseadas para su uso en el tratamiento. En el presente documento también se desvela una composición estimulada de salida o enriquecida producida por cualquiera de los métodos de estimulación de linfocitos T descritos en la presente memoria.

En algunos casos, las células producidas utilizando cualquiera de los métodos de incubación (p. ej., estimulación) descritos en el presente documento, tales como células genomodificadas con un receptor recombinante (p. ej., linfocitos T CAR), se proporcionan como composiciones, incluyendo composiciones y formulaciones farmacéuticas, tales como composiciones en forma de monodosis que incluyen la cantidad de células para su administración a una dosis o fracción determinada de la misma. Las composiciones y formulaciones farmacéuticas generalmente incluyen uno o más vehículos o excipientes opcionales farmacéuticamente aceptables. En algunos casos, la composición incluye al menos un agente terapéutico adicional.

En algunos casos, se genera o fabrica una composición de células con fines de terapia celular. En algunos casos, la composición celular es una composición o formulación farmacéutica. Dichas composiciones pueden utilizarse de acuerdo con los métodos desvelados, por ejemplo, para evaluar su liberación para su uso 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 tal 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 administraría la formulación. En algunos casos, los métodos desvelados en el presente documento pueden utilizarse para comparar la expresión de glucanos de superficie de composiciones celulares compuestas por las mismas células genomodificadas, pero con formulaciones farmacéuticas diferentes.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a 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 casos particulares, los métodos desvelados en el presente documento pueden utilizarse para comparar la expresión de glucanos de superficie de composiciones celulares compuestas por las mismas células genomodificadas, pero con diferentes vehículos farmacéuticamente aceptables.

En algunos casos, la terapia con linfocitos T, tales como linfocitos T genomodificados (p. ej., linfocitos T CAR), se formula con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunos aspectos, la elección del vehículo viene determinada en parte por la célula en particular y/o por el método de administración. Por consiguiente, 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 algunos aspectos, se utiliza una mezcla de dos o más conservantes. El conservante o las mezclas de los mismos están normalmente presentes en una cantidad de aproximadamente el 0,0001 % a aproximadamente el 2 % en peso de la composición total. Se describen vehículos, p. ej., en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980). Los vehículos farmacéuticamente aceptables son, en general, no tóxicos para los destinatarios a las posologías 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 octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos, tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como seroalbúmina, 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 incluyendo 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 (p. ej., complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, tales como polietilenglicol (PEG).

Los agentes tamponadores en algunos aspectos se incluyen en las composiciones. Como agentes tamponadores adecuados se incluyen, por ejemplo, ácido cítrico, citrato de sodio, ácido fosfórico, fosfato de potasio y diversos otros ácidos y sales. En algunos aspectos, se usa una mezcla de dos o más agentes tamponadores. El agente tamponador 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 ilustrativos con más detalle en, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21ª ed. (1 de mayo de 2005).

Las formulaciones pueden incluir soluciones acuosas. La formulación o composición también puede contener más de un principio activo útil para la indicación, enfermedad o afección particular que se va a prevenir o a tratar con las células, que incluya uno o más principios activos cuyas actividades sean complementarias a las de las células y/o las respectivas actividades no se afecten negativamente entre sí. Dichos principios activos están convenientemente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el fin previsto. Por tanto, en algunos casos, la composición farmacéutica incluye además otros agentes o fármacos farmacéuticamente activos, tales como agentes quimioterápicos, p. ej., asparaginasa, busulfán, carboplatino, cisplatino, daunorrubicina, doxorubicina, fluorouracilo, gemcitabina, hidroxiurea, metotrexato, paclitaxel, rituximab, vinblastina, vincristina, etc.

En algunos casos, la composición farmacéutica contiene células en cantidades eficaces para tratar o prevenir la enfermedad o afección, tal como una cantidad terapéuticamente eficaz o profilácticamente eficaz. En algunos casos, la eficacia terapéutica o profiláctica se controla mediante la evaluación periódica de los sujetos tratados. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, se repite el tratamiento 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 embolada de la composición, mediante múltiples administraciones en embolada de la composición o mediante administración por infusión continua de la composición.

Las células pueden formularse para su administración utilizando técnicas de administración, formulaciones y/o dispositivos estándar. Se desvelan formulaciones y dispositivos, tales como jeringuillas y viales, para la conservación y la administración de las composiciones. Con respecto a las células, la administración puede ser autóloga o heteróloga. Por ejemplo, se pueden obtener células o progenitores inmunosensibles de un sujeto y administrarlas al mismo sujeto o a un sujeto diferente, compatible. Células inmunosensibles obtenidas de sangre periférica o de su descendencia (p. ej., obtenidas *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*) puede administrarse mediante inyección localizada, incluida la administración por catéter, inyección sistémica, inyección localizada, inyección intravenosa o administración parenteral. Cuando se administra una composición terapéutica (p. ej., una composición farmacéutica que contiene una célula inmunosensible genomodificada), generalmente ésta se formulará en forma de dosis unitaria inyectable (solución, suspensión, emulsión).

Las formulaciones incluyen las que son para administración oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, pulmonar, transdérmica, intramuscular, intranasal, bucal, sublingual o mediante supositorios. En algunos casos, el agente o las poblaciones celulares se administran por vía parenteral. El término "parenteral", como se utiliza en el presente documento, incluye la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, rectal, vaginal e intraperitoneal. En algunos casos, 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 se proporcionan como preparaciones líquidas asépticas, p. ej., soluciones; suspensiones, emulsiones, dispersiones acuosas isotónicas o composiciones viscosas, que, en algunos aspectos, pueden tamponarse a un pH seleccionado. Las preparaciones líquidas son normalmente más fáciles de preparar que los geles, que otras composiciones viscosas y que las composiciones sólidas. Adicionalmente, las composiciones líquidas son algo más cómodas de administrar, especialmente por inyección. Las composiciones viscosas, por otro lado, se pueden formular dentro del intervalo de viscosidad apropiado para proporcionar períodos de contacto más largos con tejidos específicos. Las composiciones líquidas o viscosas pueden comprender vehículos, que pueden ser

un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido) y mezclas adecuadas de los mismos.

Se pueden preparar soluciones inyectables asépticas incorporando las células en un disolvente, tal como en mezcla con un vehículo, diluyente o excipiente adecuado, tal como agua esterilizada, solución salina fisiológica, glucosa, dextrosa o similares. Las composiciones también se pueden liofilizar. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes, agentes dispersantes o emulsionantes (por ejemplo, metilcelulosa), agentes tamponadores del pH, aditivos gelificantes o potenciadores de la viscosidad, conservantes, agentes aromatizantes, colorantes y similares, en función de la vía de administración y de la preparación deseada. En algunos aspectos, se pueden consultar los textos convencionales para preparar preparaciones adecuadas.

Pueden añadirse diversos aditivos que mejoren la estabilidad y la esterilidad de las composiciones, incluidos conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y tampones. Se puede garantizar la prevención de la acción de microorganismos mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede realizarse utilizando agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las formulaciones que han de usarse para la administración *in vivo* están generalmente esterilizadas. La esterilización puede realizarse fácilmente, p. ej., mediante filtración a través de membranas de filtración asépticas.

Para la prevención o el tratamiento de una enfermedad, la dosis apropiada puede depender del tipo de enfermedad que se vaya a tratar, del tipo de agente o agentes, del tipo de células o receptores recombinantes, de la gravedad y de la evolución de la enfermedad, de si el agente o las células se administran con fines preventivos o terapéuticos, de la terapia previa, de los antecedentes del sujeto y de la respuesta al agente o a las células, y del criterio del médico tratante. En algunos casos, las composiciones se administran adecuadamente al sujeto de una sola vez o a lo largo de una serie de tratamientos.

En el presente documento también se desvelan métodos de uso y usos de las células y composiciones, tales como las presentes en una composición de salida descrita en el presente documento, en el tratamiento de enfermedades, afecciones y trastornos en los que se expresa el antígeno reconocido por el receptor recombinante (p. ej. CAR). En el presente documento también se desvelan métodos de tratamiento que incluyen la administración a un sujeto de una composición de salida o de salida enriquecida producida por cualquiera de los métodos de incubación (p. ej., estimulación) descritos. En algunos casos, el método incluye generar linfocitos T genomodificados usando cualquiera de los métodos descritos en el presente documento y administrar los linfocitos T genomodificados producidas por los métodos descritos en el presente documento.

Se desvelan métodos de administración de las células y composiciones genomodificadas, y usos de dichas células y composiciones genomodificadas para tratar o prevenir enfermedades, afecciones y trastornos, incluyendo cánceres. En algunos casos, la terapia celular es o comprende la administración de células, tales como células inmunitarias, por ejemplo, linfocitos T, que se dirigen a una molécula expresada en la superficie de una lesión, tal como un tumor o un cáncer. Los métodos y usos desvelados incluyen métodos y usos de terapia celular adoptiva. En algunos casos, los métodos incluyen la administración de las células genomodificadas o de una composición que contenga las células, tal como células de una composición de salida como se describe, a un sujeto, tejido o célula, tal como uno que padece, corre el riesgo de padecer o se sospecha que padece, la enfermedad, afección o trastorno. En algunos casos, las células, poblaciones y composiciones, se administran a un sujeto que padece la enfermedad o afección particular que se va a tratar, p. ej., mediante terapia celular adoptiva, tal como la terapia adoptiva con linfocitos T. En algunos casos, las células o composiciones que se administran al sujeto, tal como a un sujeto que padece o que corre el riesgo de padecer la enfermedad o afección, reducen uno o más síntomas de la enfermedad o afección, tal como disminuyendo la carga tumoral en un cáncer que expresa un antígeno reconocido por un linfocito T genomodificado.

La enfermedad o afección que se trata en algunos aspectos puede ser cualquiera en la que la expresión de un antígeno esté asociada a, sea específica de y/o se exprese en, una célula o tejido de una enfermedad, trastorno o afección y/o esté implicada en la etiología de una enfermedad, afección o trastorno, p. ej., cause, agrave o intervenga de otro modo en dicha enfermedad, afección o trastorno. Como enfermedades y afecciones ilustrativas pueden incluirse enfermedades o afecciones asociadas a neoplasia maligna o a la transformación de las células (p. ej. cáncer), enfermedades autoinmunitarias o inflamatorias, o una enfermedad infecciosa, p. ej., causada por una bacteria, un virus u otro patógeno. Anteriormente se han descrito ejemplos de antígenos, que incluyen antígenos asociados a diversas enfermedades y afecciones que pueden tratarse. En casos particulares, el polipéptido inmunomodulador y/o el receptor recombinante, p. ej., el receptor quimérico para el antígeno o TCR, se une específicamente a un antígeno asociado a la enfermedad o afección. En algunos casos, el sujeto tiene una enfermedad, un trastorno o una afección, opcionalmente un cáncer, un tumor, una enfermedad, una afección o un trastorno autoinmunitario, o una enfermedad infecciosa.

En algunos casos, la enfermedad, el trastorno o la afección, incluye tumores asociados a diversos cánceres. El cáncer puede ser, en algunos casos, cualquier cáncer localizado en el organismo de un sujeto, tal como, pero sin limitación, cánceres localizados en la cabeza y el cuello, mama, hígado, colon, ovario, próstata, páncreas, cerebro, cuello uterino,

hueso, piel, ojo, vejiga, estómago, esófago, peritoneo o pulmón. Por ejemplo, el agente anticanceroso se puede utilizar para el tratamiento del cáncer de colon, cáncer cervicouterino, cáncer del sistema nervioso central, cáncer de mama, cáncer de vejiga, carcinoma anal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de pulmón microcítico, carcinoma pulmonar no microcítico, cáncer neuroendocrino, carcinoma de tejidos blandos, cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer de vesícula biliar o cáncer de esófago. En algunos casos, el cáncer puede ser un cáncer hemático. En algunos casos, la enfermedad, el trastorno o la afección, es un tumor, tal como un tumor sólido, linfoma, leucemia, neoplasia hemática, tumor metastásico, u otro tipo de cáncer o tumor. En algunos casos, la enfermedad, el trastorno o la afección, se selecciona entre los cánceres de colon, pulmón, hígado, mama, próstata, ovario, piel, melanoma, hueso, cáncer de cerebro, cáncer de ovario, cánceres epiteliales, carcinoma de células renales, adenocarcinoma pancreático, carcinoma cervicouterino, cáncer colorrectal, glioblastoma, neuroblastoma, sarcoma de Ewing, meduloblastoma, osteosarcoma, sarcoma sinovial y mesotelioma.

Entre las enfermedades, las afecciones y los trastornos, se encuentran los tumores, incluyendo tumores sólidos, neoplasias hemáticas y melanomas, y se incluyen tumores localizados y metastásicos, enfermedades infecciosas, tales como una infección por un virus u otro patógeno, p. ej., VIH, VHC, VHB, CMV, VPH, y enfermedades parasitarias, autoinmunitarias e inflamatorias. En algunos casos, la enfermedad, el trastorno o la afección, es un tumor, cáncer, neoplasia maligna, neoplasia u otra enfermedad o trastorno proliferativo. Dichas enfermedades incluyen, pero sin limitación, leucemia, linfoma, p. ej., leucemia mieloide (o mielógena) aguda (LMA), leucemia mieloide (o mielógena) crónica (LMC), leucemia linfocítica (o linfoblástica) aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), tricoleucemia (TCL), linfoma linfocítico de células pequeñas (LLCP), linfoma de células del manto (LCM), linfoma de la zona marginal, linfoma de Burkitt, linfoma hodgkiniano (LH), linfoma no hodgkiniano (LNH), linfoma de células grandes anaplásicas (LPGA), linfoma folicular, linfoma folicular refractario, linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL) y mieloma múltiple (MM), una neoplasia maligna de linfocitos B seleccionada entre leucemia linfoblástica aguda (LLA), LLA del adulto, leucemia linfoblástica crónica (LLC), linfoma no hodgkiniano (LNH) y linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL).

En algunos casos, la enfermedad o afección es una enfermedad o afección infecciosa, tal como, pero sin limitación, una infección vírica, retrovírica, bacteriana y protozoaria, inmunodeficiencia, citomegalovirus (CMV), virus Epstein Barr (VEB), adenovirus, poliomavirus BK. En algunos casos, la enfermedad o afección es una enfermedad o afección autoinmunitaria o inflamatoria, tales como artritis, p. ej., artritis reumatoide (AR), diabetes de tipo I, lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, esclerodermia, enfermedad tiroidea autoinmunitaria, enfermedad de Grave, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, asma y/o una enfermedad o afección asociada al trasplante.

En algunos casos, el antígeno asociado a la enfermedad o al trastorno se selecciona del grupo que consiste en receptor huérfano de tirosina cinasa ROR1, antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA), anhidrasa carbónica 9 (CA-CAIX), tEGFR, Her2/neu (tirosina cinasa receptora erbB2), L1-CAM, CD19, CD20, CD22, mesotelina, CEA, antígeno de superficie de la hepatitis B, receptor anti-folato, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, glucoproteína epitelial 2 (EPG-2), glucoproteína epitelial 40 (EPG-40), receptor de efrina A2 (EPHA2), Her2/neu (tirosina cinasa receptora erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), dímeros erbB, mutación del receptor del factor de crecimiento epidérmico de tipo III (EGFR vIII), proteína de unión a folato (FBP), FCRL5, receptor Fc de tipo 5 (FCRL5; también conocido como receptor Fc homólogo 5 o FCRH5), receptor de acetilcolina fetal, gangliósido GD2, gangliósido GD3, Receptor 5D acoplado a proteína G (GPCR5D), HMW-MAA, IL-22R-alfa, IL-13R-alfa2, receptor del dominio de inserción de cinasa (kdr), cadena ligera kappa, miembro A de la familia 8 que contiene repeticiones ricas en leucina (LRR8A), Lewis Y, molécula L1 de adhesión celular, (L1-CAM), antígeno asociado a melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, antígeno preferentemente expresado del melanoma (PRAME), survivina, TAG72, B7-H6, receptor IL-13 alfa 2 (IL-13Ra2), CA9, GD3, HMW-MAA, CD171, G250/CAIX, antígeno leucocitario humano A1 (HLA-A1), MAGE A1, HLA-A2, NY-ESO-1, PSCA, receptor alfa de folato, CD44v6, CD44v7/8, integrina  $\alpha\beta6$  (integrina  $\alpha v\beta6$ ), 8H9, NCAM, receptores de VEGF, 5T4, AchR fetal, ligandos citolíticos naturales del miembro D de grupo 2 (NKG2D), CD44v6, antígeno dual, un antígeno del cáncer de testículo, mesotelina, CMV murino, mucina 1 (MUC1), MUC16, antígeno prostático de células madre (PSCA), NKG2D, un antígeno del cáncer de testículo, antígeno 1B de cáncer/testículo (CTAG, también conocido como NY-ESO-1 y LAGE-2), MART-1, glucoproteína 100 (gp100), antígeno oncofetal, ROR1, glucoproteína trofoblástica (TPBG también conocida como 5T4), TAG72, VEGF-R2, antígeno carcinoembrionario (CEA), Her2/neu, receptor de estrógenos, receptor de progesterona, efrina B2, CD123, c-Met, GD-2, GD2 O-acetilado (OGD2), CE7, tumor de Wilms 1 (WT-1), una ciclina, ciclina A2, ligando 1 de quimiocinas con motivo C-C (CCL-1), CD138, un antígeno específico de patógeno y un antígeno asociado a una etiqueta universal, y/o moléculas biotiniladas, y/o moléculas expresadas por el VIH, VHC, VHB u otros patógenos.

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

A2 (EPHa2), receptor de estrógenos, receptor Fc de tipo 5 (FCRL5; también conocido como receptor Fc homólogo 5 o FCRH5), receptor de acetilcolina fetal (AChR fetal), una proteína de unión a folato (FBP), receptor alfa de folato, gangliósido GD2, GD2 O-acetilado (OGD2), gangliósido GD3, glucoproteína 100 (gp100), glipicano-3 (GPC3), Receptor 5D acoplado a proteína G (GPCR5D), Her2/neu (tirosina cinasa receptora erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), dímeros erbB, antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA) humano, antígeno de superficie de la hepatitis B, antígeno leucocitario humano A1 (HLA-A1), antígeno leucocitario humano A2 (HLA-A2), receptor alfa de IL-22 (IL-22R $\alpha$ ), receptor alfa 2 de IL-13 (IL-13R $\alpha$ 2), receptor del dominio de inserción de cinasa (kdr), cadena ligera kappa, molécula L1 de adhesión celular (L1-CAM), epítipo CE7 de L1-CAM, miembro A de la familia 8 que contiene repeticiones ricas en leucina (LRR8A), Lewis Y, antígeno asociado a melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, mesotelina (MSLN), c-Met, citomegalovirus (CMV) murino, mucina 1 (MUC1), MUC16, ligandos citolíticos naturales del miembro D de grupo 2 (NKG2D), melan A (MART-1), molécula de adhesión celular neural (NCAM), antígeno oncofetal, antígeno preferentemente expresado del melanoma (PRAME), receptor de progesterona, un antígeno específico de próstata, antígeno prostático de células madre (PSCA), antígeno prostático específico de membrana (PSMA), receptor 1 huérano similar a tirosina cinasa receptora (ROR1), survivina, glucoproteína trofoblástica (TPBG también conocida como 5T4), glucoproteína 72 asociada a tumores (TAG72), proteína 1 relacionada con tirosinasa (TRP1, también conocida como TYRP1 o gp75), proteína 2 relacionada con tirosinasa (TRP2, también conocida como dopacromo tautomerasa, dopacromo delta-isomerasa o DCT), receptor del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR), receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular ((VEGFR2), Tumor de Wilms 1 (WT-1), un antígeno específico de patógeno o expresado por patógeno, o un antígeno asociado con una etiqueta universal, y/o moléculas biotiniladas, y/o moléculas expresadas por el VIH, VHC, VHB u otros patógenos.

En algunos casos, la enfermedad o afección es una neoplasia maligna de linfocitos B. En algunos casos, la neoplasia maligna de linfocitos B es una leucemia o un linfoma. En algunos aspectos, la enfermedad o afección es leucemia linfoblástica aguda (LLA), LLA del adulto, leucemia linfoblástica crónica (LLC), linfoma no hodgkiniano (LNH) o linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBGL). En algunos casos, la enfermedad o afección es un LNH, tal como o incluyendo un LNH que sea un LNH agresivo, linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBGL), NOS (*de novo* y transformado desde indolente), linfoma mediastínico primario de linfocitos B grandes (LMPLBL), linfoma de linfocitos B grandes rico en linfocitos T/histiocitos (LLBGRLH), linfoma de Burkitt, linfoma de células del manto (LCM) o linfoma folicular (LF), opcionalmente, linfoma folicular de grado 3B (LF3B). En algunos aspectos, el receptor recombinante, tal como un CAR, se une específicamente a un antígeno asociado a la enfermedad o afección o expresado en células del entorno de una lesión asociada a la neoplasia maligna de linfocitos B. Los antígenos a los que se dirigen los receptores incluyen, en algunos casos, antígenos asociados a una neoplasia maligna de linfocitos B, tal como cualquiera de una serie de marcadores de linfocitos B conocidos. En algunos casos, el antígeno al que se dirige el receptor es CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Igkappa, Iglambda, CD79a, CD79b o CD30.

En algunos casos, la enfermedad o afección es un mieloma, tal como mieloma múltiple. En algunos aspectos, el receptor recombinante, tal como un CAR, se une específicamente a un antígeno asociado a la enfermedad o afección o expresado en células del entorno de una lesión asociada al mieloma múltiple. Los antígenos a los que se dirigen los receptores incluyen en algunos casos, antígenos asociados a mieloma múltiple, tal como GPRC5d o BCMA.

En algunos casos, el antígeno es un antígeno específico de patógeno o expresado por patógeno. En algunos casos, 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, las células inmunitarias expresan un receptor de linfocitos T (TCR) u otro receptor de unión a antígeno. En algunos casos, las células inmunitarias expresan un receptor recombinante, tal como un TCR transgénico o un receptor quimérico para el antígeno (CAR). En algunos casos, las células son autólogas para el sujeto. En algunos casos, las células son alogénicas al sujeto.

Se conocen métodos de administración de células para terapia celular adoptiva y pueden utilizarse junto con los métodos y composiciones desvelados. Por ejemplo, se describen métodos de terapia adoptiva con linfocitos T, p. ej., en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º 2003/0170238 de Gruenberg et al; en la patente de Estados Unidos N.º 4.690.915 de Rosenberg; Rosenberg (2011) Nat Rev Clin Oncol. 8(10):577-85). Véase, p. ej., 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.

En algunos casos, la terapia celular, p. ej., la terapia adoptiva con linfocitos T, se realiza mediante transferencia autóloga, en la que las células se aíslan del sujeto que va a recibir la terapia celular, o de una muestra obtenida del sujeto, y/o se preparan de otro modo. Por tanto, en algunos aspectos, las células se obtienen de un sujeto, p. ej., de un paciente que necesita un tratamiento y las células, después del aislamiento y el procesamiento, se administran al mismo sujeto.

En algunos casos, la terapia celular, p. ej., la terapia adoptiva con linfocitos T, se realiza mediante transferencia alogénica, en la que las células se aíslan de un sujeto distinto del que va a recibir la terapia, o del que finalmente recibirá la terapia celular, y/o se preparan de otro modo, p. ej., de un primer sujeto. En dichos casos, las células se administran

entonces a un sujeto diferente, p. ej., a un segundo sujeto, de la misma especie. En algunos casos, el primer y segundo sujetos son genéticamente idénticos. En algunos casos, el primer y segundo sujetos son genéticamente similares. En algunos casos, el segundo sujeto expresa la misma clase o supertipo de HLA que el primer sujeto.

5 En determinados casos, las células, o poblaciones individuales de subtipos de células, se administran al sujeto a un intervalo de aproximadamente un millón a aproximadamente 100.000 millones de células y/o esa cantidad de células por kilogramo de peso corporal, tal como, p. ej., de 1 millón a aproximadamente 50 mil millones de células (p. ej., aproximadamente 5 millones de células, aproximadamente 25 millones de células, aproximadamente 500 millones de células, aproximadamente 1 000 millones de células, aproximadamente 5 000 millones de células, aproximadamente 10 000 millones de células, aproximadamente 30 000 millones de células, aproximadamente 40 000 millones de células o un intervalo definido por dos valores cualesquiera de los anteriores), tal como de aproximadamente 10 millones a aproximadamente 100 mil millones de células (p. ej., aproximadamente 20 millones de células, aproximadamente 30 millones de células, aproximadamente 40 millones de células, aproximadamente 60 millones de células, aproximadamente 70 millones de células, aproximadamente 80 millones de células, aproximadamente 90 millones de células, aproximadamente 10 000 millones de células, aproximadamente 25 000 millones de células, aproximadamente 50 000 millones de células, aproximadamente 75 000 millones de células, aproximadamente 90 000 millones de células, o un intervalo definido por dos valores cualesquiera de los anteriores) y, en algunos casos, de aproximadamente 100 millones de células a aproximadamente 50 000 millones de células (p. ej., aproximadamente 120 millones de células, aproximadamente 250 millones de células, aproximadamente 350 millones de células, aproximadamente 450 millones de células, aproximadamente 650 millones de células, aproximadamente 800 millones de células, aproximadamente 900 millones de células, aproximadamente 3 000 millones de células, aproximadamente 30 000 millones de células, aproximadamente 45 mil millones de células) o cualquier valor entre estos intervalos y/o por kilogramo de peso corporal. La posología pueden variar dependiendo de los atributos particulares de la enfermedad o del trastorno y/o del paciente y/o de otros tratamientos.

25 En algunos casos, por ejemplo, cuando el sujeto es un ser humano, la dosis incluye menos de aproximadamente  $5 \times 10^8$  células totales que expresan receptores recombinantes (p. ej., CAR), linfocitos T o células mononucleares de sangre periférica (CMSP). En algunos casos, por ejemplo, cuando el sujeto es un ser humano, la dosis incluye menos de aproximadamente  $1 \times 10^8$  células totales que expresan receptores recombinantes (p. ej., CAR), linfocitos T o células mononucleares de sangre periférica (CMSP), p. ej., en el intervalo de aproximadamente  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^8$  de dichas células, tal como  $2 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$  o  $1 \times 10^8$  o el total de dichas células, o el intervalo entre dos valores cualesquiera de los anteriores.

35 En algunos casos, la dosis de células genomodificadas comprende de, o de aproximadamente,  $1 \times 10^5$  a  $5 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR,  $1 \times 10^5$  a  $2,5 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR,  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^8$  total de linfocitos T que expresan CAR,  $1 \times 10^5$  a  $5 \times 10^7$  linfocitos T totales que expresan CAR,  $1 \times 10^5$  a  $2,5 \times 10^7$  linfocitos T totales que expresan CAR,  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^7$  linfocitos T totales que expresan CAR,  $1 \times 10^5$  a  $5 \times 10^6$  linfocitos T totales que expresan CAR,  $1 \times 10^5$  a  $2,5 \times 10^6$  linfocitos T totales que expresan CAR,  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^6$  linfocitos T totales que expresan CAR,  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR,  $1 \times 10^6$  a  $2,5 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR,  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR,  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^7$  linfocitos T totales que expresan CAR,  $1 \times 10^6$  a  $2,5 \times 10^7$  linfocitos T totales que expresan CAR,  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  linfocitos T totales que expresan CAR,  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  linfocitos T totales que expresan CAR,  $1 \times 10^6$  a  $2,5 \times 10^6$  linfocitos T totales que expresan CAR,  $2,5 \times 10^6$  a  $5 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR,  $2,5 \times 10^6$  a  $2,5 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR,  $2,5 \times 10^6$  a  $1 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR,  $2,5 \times 10^6$  a  $5 \times 10^7$  linfocitos T totales que expresan CAR,  $2,5 \times 10^6$  a  $2,5 \times 10^7$  linfocitos T totales que expresan CAR,  $2,5 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  linfocitos T totales que expresan CAR,  $5 \times 10^6$  a  $5 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR,  $5 \times 10^6$  a  $2,5 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR,  $5 \times 10^6$  a  $1 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR,  $5 \times 10^6$  a  $5 \times 10^7$  linfocitos T totales que expresan CAR,  $5 \times 10^6$  a  $2,5 \times 10^7$  linfocitos T totales que expresan CAR,  $5 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  linfocitos T totales que expresan CAR,  $1 \times 10^7$  a  $5 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR,  $1 \times 10^7$  a  $2,5 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR,  $1 \times 10^7$  a  $1 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR,  $1 \times 10^7$  a  $5 \times 10^7$  linfocitos T totales que expresan CAR,  $1 \times 10^7$  a  $2,5 \times 10^7$  linfocitos T totales que expresan CAR,  $2,5 \times 10^7$  a  $5 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR,  $2,5 \times 10^7$  a  $2,5 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR,  $2,5 \times 10^7$  a  $1 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR,  $2,5 \times 10^7$  a  $5 \times 10^7$  linfocitos T totales que expresan CAR,  $5 \times 10^7$  a  $5 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR,  $5 \times 10^7$  a  $2,5 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR,  $5 \times 10^7$  a  $1 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR,  $1 \times 10^8$  a  $5 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR,  $1 \times 10^8$  a  $2,5 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR o de  $2,5 \times 10^8$  a  $5 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresan CAR.

60 En algunos casos, la dosis de células genomodificadas comprende al menos o al menos aproximadamente  $1 \times 10^5$  células que expresan CAR, al menos o al menos aproximadamente  $2,5 \times 10^5$  células que expresan CAR, al menos o al menos aproximadamente  $5 \times 10^5$  células que expresan CAR, al menos o al menos aproximadamente  $1 \times 10^6$  células que expresan CAR, al menos o al menos aproximadamente  $2,5 \times 10^6$  células que expresan CAR, al menos o al menos aproximadamente  $5 \times 10^6$  células que expresan CAR, al menos o al menos aproximadamente  $1 \times 10^7$  células que expresan CAR, al menos o al menos aproximadamente  $2,5 \times 10^7$  células que expresan CAR, al menos o al menos aproximadamente  $5 \times 10^7$  células que expresan CAR, al menos o al menos aproximadamente  $1 \times 10^8$  células que expresan CAR, al menos o al menos aproximadamente  $2,5 \times 10^8$  células que expresan CAR o al menos o al menos



aproximadamente  $5 \times 10^8$  células que expresan CAR.

- En algunos casos, la terapia celular comprende la administración de una dosis que comprende un número de células de, o de aproximadamente,  $1 \times 10^5$  a  $5 \times 10^8$  células totales que expresan receptores recombinantes, linfocitos T
- 5 células totales o células mononucleares de sangre periférica (CMSP) totales, de, o de aproximadamente,  $5 \times 10^5$  a  $1 \times 10^7$  células totales que expresan receptores recombinantes, linfocitos T totales o células mononucleares de sangre periférica (CMSP) totales o de aproximadamente  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  células totales que expresan receptores recombinantes, linfocitos T totales o células mononucleares de sangre periférica (CMSP) totales, cada uno inclusive. En algunos casos, la terapia celular comprende la administración de una dosis de células que comprende un número
- 10 de células de al menos o al menos aproximadamente  $1 \times 10^5$  células totales que expresan receptores recombinantes, linfocitos T totales o células mononucleares de sangre periférica (CMSP) totales, tal como al menos o como mínimo  $1 \times 10^6$ , al menos o al menos aproximadamente  $1 \times 10^7$ , al menos o al menos aproximadamente  $1 \times 10^8$  de dichas células. En algunos casos, el número es con referencia al número total de CD3+ o CD8+, en algunos casos también a células que expresan receptores recombinantes (p. ej. CAR+). En algunos casos, la terapia celular comprende la
- 15 administración de una dosis que comprende un número de células de, o de aproximadamente,  $1 \times 10^5$  a  $5 \times 10^8$  linfocitos T CD3+ o CD8+ o células CD3+ o CD8+ totales que expresan receptores recombinantes, de, o de aproximadamente,  $5 \times 10^5$  a  $1 \times 10^7$  linfocitos T CD3+ o CD8+ o células CD3+ o CD8+ totales que expresan receptores recombinantes o de, o de aproximadamente,  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  linfocitos T CD3+ o CD8+ o células CD3+ o CD8+ totales que expresan receptores recombinantes, cada uno inclusive. En algunos casos, la terapia celular comprende
- 20 la administración de una dosis que comprende un número de células de, o de aproximadamente,  $1 \times 10^5$  a  $5 \times 10^8$  células CD3+/CAR+ o CD8+/CAR+ totales, de, o de aproximadamente,  $5 \times 10^5$  a  $1 \times 10^7$  células CD3+/CAR+ o CD8+/CAR+ totales o de, o de aproximadamente,  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  células CD3+/CAR+ o CD8+/CAR+ totales, cada uno inclusive.
- 25 En algunos casos, los linfocitos T de la dosis incluyen linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ o linfocitos T CD4+ y CD8+.

- En algunos casos, por ejemplo, cuando el sujeto es un ser humano, los linfocitos T CD8+ de la dosis, se incluyen en una dosis que incluye linfocitos T CD4+ y CD8+, incluido entre aproximadamente  $1 \times 10^6$  y  $5 \times 10^8$  células CD8+ totales que expresan receptores recombinantes (p. ej., CAR), p. ej., en el intervalo de aproximadamente  $5 \times 10^6$  a  $1 \times 10^8$  de dichas células, tal como  $1 \times 10^7$ ,  $2,5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $7,5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  o  $5 \times 10^8$  total de dichas células, o el
- 30 intervalo entre dos valores cualquiera de los anteriores. En algunos casos, al paciente se le administran múltiples dosis, y cada una de las dosis o la dosis total puede estar dentro de cualquiera de los valores anteriores. En algunos casos, la dosis de células comprende la administración de, o de aproximadamente,  $1 \times 10^7$  a  $0,75 \times 10^8$  linfocitos T CD8+ totales que expresan receptores recombinantes, de  $1 \times 10^7$  a  $2,5 \times 10^7$  linfocitos T CD8+ totales que expresan
- 35 receptores recombinantes, de, o de aproximadamente,  $1 \times 10^7$  a  $0,75 \times 10^8$  linfocitos T CD8+ totales que expresan receptores recombinantes, cada uno inclusive. En algunos casos, la dosis de células comprende la administración de, o de aproximadamente,  $1 \times 10^7$ ,  $2,5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $7,5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  o  $5 \times 10^8$  linfocitos T CD8+ totales que expresan receptores recombinantes.
- 40 En algunos casos, la dosis de células, p. ej., de linfocitos T que expresan receptores recombinantes, se administra al sujeto como una sola dosis o se administra una sola vez en un periodo de dos semanas, un mes, tres meses, seis meses, 1 año o más.

- En algunos aspectos, las composiciones y formulaciones farmacéuticas se proporcionan como composiciones en
- 45 forma de monodosis que incluyen la cantidad de células para su administración a una dosis o fracción determinada de la misma. En algunos casos, los métodos desvelados producen células en un plazo predecible a la dosificación en comparación con otros métodos de incubación (p. ej., estimulación) de células. En algunos casos, la dosis de células para la administración se determina en función del número de células de tipo indiferenciado en la composición de entrada. En algunos casos, una dosis que comprende células fabricadas utilizando un proceso que comprende un
- 50 periodo de estimulación más corto (por ejemplo, en algunos casos, un tiempo de incubación de, o de aproximadamente, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días o 6 días, de células con un agente estimulador) puede ser inferior a una dosis que comprenda células fabricadas en un proceso que comprenda un periodo de estimulación más largo. En algunos casos, una dosis que comprende células fabricadas utilizando un proceso que comprende un periodo de estimulación más corto puede comprender un mayor porcentaje o proporción de células de tipo indiferenciado, y puede
- 55 comprender menos células totales en comparación con una dosis que comprenda células fabricadas utilizando un proceso que comprenda un periodo de estimulación más largo.

- En algunos casos, las células de la dosis pueden administrarse a través de la administración de una pluralidad de composiciones o soluciones, tal como una primera y una segunda, opcionalmente más, cada una de las cuales
- 60 contiene algunas células de la dosis. En algunos aspectos, la pluralidad de composiciones, cada una de las cuales contiene una población y/o subtipos de células diferentes, se administra por separado o de forma independiente, opcionalmente en un periodo de tiempo determinado. Por ejemplo, las poblaciones o subtipos de células pueden incluir linfocitos T CD8+ y CD4+, respectivamente, y/o poblaciones enriquecidas en CD8+ y CD4+, respectivamente, p. ej., linfocitos T CD4+ y/o CD8+, cada una de las cuales incluye células genomodificadas para expresar el receptor
- 65 recombinante. En algunos casos, 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, la administración de la composición o de la dosis, p. ej., la administración de la pluralidad de composiciones celulares, implica la administración de las composiciones celulares por separado. En algunos aspectos, las distintas administraciones se llevan a cabo simultánea o secuencialmente, en cualquier orden. En algunos casos, la dosis comprende una primera composición y una segunda composición, y la primera composición y la segunda composición se administran con un intervalo de diferencia de 0 a 12 horas, de 0 a 6 horas o de 0 a 2 horas. En algunos casos, el inicio de la administración de la primera composición y el inicio de la administración de la segunda composición se llevan a cabo en un intervalo de diferencia no superior a 2 horas, no superior a 1 hora o no superior a 30 minutos, no superior a 15 minutos, no superior a 10 minutos o no superior a 5 minutos. En algunos casos, el inicio y/o la finalización de la administración de la primera composición y la finalización y/o inicio de la administración de la segunda composición se llevan a cabo en un intervalo de diferencia no superior a 2 horas, no superior a 1 hora o no superior a 30 minutos, no superior a 15 minutos, no superior a 10 minutos o no superior a 5 minutos.
- En alguna composición, la primera composición, p. ej., primera composición de la dosis, comprende linfocitos T CD4+. En alguna composición, la primera composición, p. ej., primera composición de la dosis, comprende linfocitos T CD8+. En algunos casos, la primera composición se administra antes que la segunda composición.
- En algunos casos, la dosis o composición de células incluye una proporción definida o diana de células CD4+ que expresan un receptor recombinante con respecto a células CD8+ que expresan un receptor recombinante y/o de células CD4+ con respecto a células CD8+, cuya proporción opcionalmente es de aproximadamente 1:1 o está entre aproximadamente 1:3 y aproximadamente 3:1, tal como aproximadamente 1:1. En algunos aspectos, la administración de una composición o dosis con la proporción diana o deseada de diferentes poblaciones celulares (tal como la proporción CD4+:CD8+ o la proporción CAR+CD4+:CAR+CD8+, p. ej., 1:1) implica la administración de una composición celular que contiene una de las poblaciones y después la administración de una composición celular distinta que comprende la otra de las poblaciones, donde la administración alcanza o alcanza aproximadamente la proporción diana o deseada. En algunos aspectos, la administración de una dosis o composición de células a una proporción definida conduce a una mejora de la ampliación, persistencia y/o actividad antitumoral de la terapia con linfocitos T.
- En algunos casos, el sujeto recibe múltiples dosis, p. ej., dos o más dosis o múltiples dosis consecutivas, de las células. En algunos casos, se administran dos dosis a un sujeto. En algunos casos, el sujeto recibe la dosis consecutiva, p. ej., la segunda dosis, se administra aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 días después de la primera dosis. En algunos casos, después de la primera dosis, se administran múltiples dosis consecutivas, de tal manera que se administren una o varias dosis adicionales después de la administración de la dosis consecutiva. En algunos aspectos, el número de células administradas al sujeto en la dosis adicional es igual o similar al de la primera dosis y/o dosis consecutiva. En algunos casos, la dosis o dosis adicionales son mayores que las dosis anteriores.
- En algunos aspectos, el tamaño de la primera dosis y/o dosis consecutiva se determina en función de uno o más criterios tales como la respuesta del sujeto al tratamiento anterior, p. ej., a la quimioterapia, a la carga de enfermedad en el sujeto, tal como la carga tumoral, volumen, tamaño o grado, extensión o tipo de metástasis, estadio, y/o probabilidad o incidencia de que el sujeto desarrolle resultados tóxicos, p. ej., CRS (*cytokine release syndrome*, síndrome de liberación de citocinas), síndrome de activación de macrófagos, síndrome de lisis tumoral, neurotoxicidad, y/o una respuesta inmunitaria del hospedador contra las células y/o los receptores recombinantes que se administran.
- En algunos aspectos, el tiempo entre la administración de la primera dosis y la administración de la dosis consecutiva es de aproximadamente 9 a aproximadamente 35 días, de aproximadamente 14 a aproximadamente 28 días o de 15 a 27 días. En algunos casos, la administración de la dosis consecutiva se produce en un momento posterior a aproximadamente 14 días e inferior a aproximadamente 28 días después de la administración de la primera dosis. En algunos aspectos, el tiempo entre la primera dosis y la dosis consecutiva es de aproximadamente 21 días. En algunos casos, después de la administración de la dosis consecutiva, se administran una o varias dosis adicionales, p. ej., dosis consecutivas. En algunos aspectos, la dosis o dosis consecutivas adicionales se administran al menos aproximadamente 14 días y menos de aproximadamente 28 días después de la administración de una dosis anterior.
- En algunos casos, la dosis adicional se administra en menos de aproximadamente 14 días después de la dosis anterior, por ejemplo, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 semanas después de la dosis anterior. En algunos casos, no se administra ninguna dosis en menos de aproximadamente 14 días después de la dosis anterior y/o no se administra ninguna dosis en más de aproximadamente 28 días después de la dosis anterior.
- En algunos casos, la dosis de células, p. ej., células que expresan receptores recombinantes, comprende dos dosis (p. ej., una dosis doble), que comprende una primera dosis de los linfocitos T y una dosis consecutiva de los linfocitos T, en donde una o ambas de la primera dosis y de la segunda dosis comprenden la administración de la dosis dividida de linfocitos T.
- En algunos casos, las células se administran como parte de otro tratamiento combinado adicional, tal como de manera simultánea o de manera secuencial con, en cualquier orden, otra intervención terapéutica, tal como un anticuerpo o

célula o receptor o agente genomodificado, tal como un agente citotóxico o terapéutico. Por ejemplo, en algunos casos, un agente anticanceroso o inmunomodulador puede utilizarse en combiterapia con terapia celular adoptiva con células genomodificadas que expresan un receptor recombinante, p. ej., un CAR. En algunos contextos, las células se coadministran con otra terapia lo suficientemente cercana en el tiempo como para que las poblaciones de células mejoren el efecto del uno o más agentes terapéuticos adicionales, o viceversa. En algunos casos, las células se administran antes que el uno o más agentes terapéuticos adicionales. En algunos casos, las células se administran después del uno o más agentes terapéuticos adicionales.

En algunos casos, el uno o más agentes terapéuticos adicionales incluyen una citocina, tal como IL-2, por ejemplo, para mejorar la persistencia. En algunos casos, los métodos comprenden la administración de un agente quimioterápico. En algunos casos, el uno o más agentes terapéuticos adicionales incluyen una o más terapias de linfocitorreducción, tal como antes o simultáneamente al inicio de la administración de las células genomodificadas. En algunos casos, la terapia de linfocitorreducción comprende la administración de una fosfamida, tal como ciclofosfamida. En algunos casos, la terapia de linfocitorreducción puede incluir la administración de fludarabina. En algunos casos, en la terapia de linfocitorreducción se excluye la fludarabina. En algunos casos, no se administra terapia de linfocitorreducción.

En algunos casos, los métodos incluyen la administración de un agente preconditionador, tal como un agente linfocitorreductor 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 preconditionador al menos 2 días antes, tal como al menos 3, 4, 5, 6 o 7 días antes, al inicio de la terapia celular. En algunos casos, al sujeto se le administra un agente preconditionador no más de 7 días antes, tal como no más de 6, 5, 4, 3 o 2 días antes, al inicio de la terapia celular.

En algunos casos, el sujeto se preconditiona con ciclofosfamida a una dosis entre o entre aproximadamente 20 mg/kg y 100 mg/kg, tal como entre o entre aproximadamente 40 mg/kg y 80 mg/kg. En algunos aspectos, el sujeto se preconditiona con o con aproximadamente 60 mg/kg de ciclofosfamida. En algunos casos, la ciclofosfamida puede administrarse en una sola dosis o puede administrarse en una pluralidad de dosis, tal como a diario, en días alternos o cada tres días. En algunos casos, la ciclofosfamida se administra una vez al día durante uno o dos días. En algunos casos, cuando el agente linfocitorreductor comprende ciclofosfamida, al sujeto se le administra ciclofosfamida a una dosis entre o entre aproximadamente 100 mg/m<sup>2</sup> y 500 mg/m<sup>2</sup>, tal como entre o entre aproximadamente 200 mg/m<sup>2</sup> y 400 mg/m<sup>2</sup>, o 250 mg/m<sup>2</sup> y 350 mg/m<sup>2</sup>, ambos inclusive. En algunos casos, al sujeto se le administran aproximadamente 300 mg/m<sup>2</sup> de ciclofosfamida. En algunos casos, la ciclofosfamida puede administrarse en una sola dosis o puede administrarse en una pluralidad de dosis, tal como a diario, en días alternos o cada tres días. En algunos casos, 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 administra aproximadamente 300 mg/m<sup>2</sup> de ciclofosfamida, a diario durante 3 días, antes del inicio de la terapia celular.

En algunos casos, cuando el agente linfocitorreductor comprende fludarabina, al sujeto se le administra fludarabina a una dosis entre o entre aproximadamente 1 mg/m<sup>2</sup> y 100 mg/m<sup>2</sup>, tal como entre o entre aproximadamente 10 mg/m<sup>2</sup> y 75 mg/m<sup>2</sup>, 15 mg/m<sup>2</sup> y 50 mg/m<sup>2</sup>, 20 mg/m<sup>2</sup> y 40 mg/m<sup>2</sup> o 24 mg/m<sup>2</sup> y 35 mg/m<sup>2</sup>, inclusive. En algunos casos, al sujeto se le administra 30 mg/m<sup>2</sup> de fludarabina. En algunos casos, la fludarabina puede administrarse en una sola dosis o puede administrarse en una pluralidad de dosis, tal como a diario, en días alternos o cada tres días. En algunos casos, 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 administra aproximadamente 30 mg/m<sup>2</sup> de fludarabina, a diario durante 3 días, antes del inicio de la terapia celular.

En algunos casos, el agente linfocitorreductor comprende una combinación de agentes, tal como una combinación de ciclofosfamida y fludarabina. Por tanto, la combinación de agentes puede incluir ciclofosfamida a cualquier dosis o pauta de administración, como se ha descrito anteriormente, y fludarabina a cualquier dosis o pauta de administración, tal como las descritas anteriormente. Por ejemplo, en algunos aspectos, al sujeto se le administra 60 mg/kg (~2 g/m<sup>2</sup>) de ciclofosfamida y de 3 a 5 dosis de 25 mg/m<sup>2</sup> de fludarabina antes de la primera o posterior dosis.

Las células pueden administrarse mediante cualquier medio adecuado. Las células se administran a una pauta posológica para lograr un efecto terapéutico, tal como una reducción de la carga tumoral. La posología y la administración pueden depender en parte de la pauta de administración del compuesto inmunomodulador, que puede administrarse antes, después y/o simultáneamente al inicio de la administración de la terapia con linfocitos T. Las diversas pautas posológicas incluyen, pero sin limitación, administraciones únicas o múltiples en diversos puntos temporales, administración en embolada e infusión en pulsos.

#### IV. KITS Y ARTÍCULOS DE FABRICACIÓN

También se desvelan artículos de fabricación, tales como kits y dispositivos, para la administración de las células a los sujetos de acuerdo con los métodos desvelados para la terapia celular adoptiva, y para la conservación y administración de las células y composiciones, tal como las composiciones de entrada o las composiciones de salida descritas.

En algunos casos, se desvela un kit que contiene las composiciones descritas anteriormente y las instrucciones de uso. En algunos casos, se desvelan kits que incluyen una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las células genomodificadas estimuladas de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. En algunos casos, se desvelan kits que incluyen una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las células genomodificadas descritas en el presente documento, e instrucciones para su administración, a un sujeto para tratar una enfermedad o afección. En algunos aspectos, las instrucciones son para seleccionar o enriquecer, a partir de una población de células, células que expresan un receptor de antígeno que contiene un dominio de unión a antígeno reconocido específicamente por un reactivo estimulador. En algunos casos, las instrucciones son para ampliar células que expresan un receptor de antígeno que contiene un dominio de unión a antígeno reconocido específicamente por el reactivo estimulador a partir de una población de células.

En algunos casos, el kit contiene además, instrucciones para administrar a un sujeto para tratar una enfermedad o afección, la célula genomodificada, utilizando los métodos descritos en el presente documento, en una combiterapia para tratar la enfermedad o afección. En algunos ejemplos, el kit contiene además un agente terapéutico. En algunos casos, el agente terapéutico es un agente inmunomodulador, un agente citotóxico, un agente anticanceroso o un agente radioterápico.

En el presente documento también se desvelan artículos de fabricación. En algunos casos, los artículos de fabricación incluyen cualquiera de las células genomodificadas, composiciones, polinucleótidos, conjunto de polinucleótidos, composición que contiene un conjunto de polinucleótidos, vectores, conjunto de vectores, composición que contiene un conjunto de vectores o kits desvelados en el presente documento.

Los artículos de fabricación o kits incluyen uno o más contenedores, normalmente una pluralidad de contenedores, material de envasado, y una etiqueta o prospecto en el contenedor o contenedores y/o envasado, o asociado a ellos, que generalmente incluye instrucciones para la administración de las células a un sujeto. Los kits y artículos de fabricación pueden incluir un contenedor y una etiqueta o prospecto en el contenedor o asociado al mismo.

En algunos casos, los contenedores contienen las células que se van a administrar, p. ej., una o más dosis unitarias de las mismas. El artículo de fabricación incluye normalmente una pluralidad de contenedores, conteniendo cada uno de ellos una dosis unitaria de las células. La dosis unitaria puede ser una cantidad o un número de las células que se van a administrar al sujeto en la primera dosis o el doble del número (o más) de las células que se van a administrar en la primera dosis o en una cualquiera o más dosis consecutivas. Esta puede ser la dosis más baja o la dosis más baja posible de las células que se administraría al sujeto en relación con el método de administración. En algunos casos, la dosis unitaria es el número mínimo de células o el número de células o el número mínimo de unidades de referencia o las unidades de referencia diana o las unidades de referencia dentro de un intervalo diana, que se administraría en una sola dosis a cualquier sujeto que tenga una enfermedad o afección particular o a cualquier sujeto, de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento.

Como contenedores adecuados se incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringuillas, bolsas de solución IV, etc. Los contenedores pueden estar formados por una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. En algunos casos, el contenedor contiene una composición que está sola o combinada con otra composición eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección. En algunos casos, el contenedor tiene un puerto de acceso aséptico. Como ejemplos de contenedores se incluyen bolsas de solución intravenosa, viales, incluidos los que tienen tapones perforables con una aguja para inyección, o frascos o viales para agentes administrados por vía oral. La etiqueta o prospecto indica que la composición se utiliza para tratar la enfermedad o afección. El artículo de fabricación puede incluir además un prospecto que indique que las composiciones pueden utilizarse para tratar una afección particular. Como alternativa o adicionalmente, el artículo de fabricación puede incluir además otro o el mismo contenedor que comprenda un tampón farmacéuticamente aceptable. Puede incluir además otros materiales tales como otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y/o jeringuillas.

En casos particulares, los contenedores son bolsas, p. ej., bolsas adaptables, tales como las adecuadas para la infusión de células a los sujetos, p. ej., bolsas adaptables de plástico o PVC, y/o bolsas de solución IV. En algunos casos, las bolsas pueden cerrarse y/o esterilizarse, para proporcionar una solución aséptica y el suministro de las células y composiciones. En algunos casos, los contenedores, p. ej., bolsas, tienen una capacidad de, o de aproximadamente, o de al menos aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 o 1000 ml, tal como una capacidad de entre, o de aproximadamente, 10 y de, o de aproximadamente, 100 o entre, o de aproximadamente 10 y de, o de aproximadamente, 500 ml, cada uno inclusive. En algunos casos, los contenedores, p. ej., bolsas, son y/o están hechas de un material que es estable y/o que proporciona una conservación y/o un mantenimiento estable de las células a una o más de diversas temperaturas, tal como a bajas temperaturas, p. ej., por debajo de, o aproximadamente a, o a o aproximadamente a, -20 °C, -80 °C, -120 °C, 135 °C y/o a temperaturas adecuadas para la crioconservación, y/o a otras temperaturas, tal como a temperaturas adecuadas para descongelar las células y a la temperatura corporal, tal como a, o aproximadamente a, 37 °C, por ejemplo, para permitir la descongelación, p. ej., en el lugar donde se encuentra el sujeto o en el lugar donde se realiza el tratamiento, p. ej., en la cabecera del paciente, inmediatamente antes del tratamiento.

Los contenedores pueden estar formados por una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. En algunos casos, el contenedor tiene uno o más puertos, p. ej., puertos de acceso asépticos, por ejemplo, para la conexión de tubos o la canulación a uno o más tubos, p. ej., para infusión intravenosa o de otro tipo y/o para conexión con fines de transferir a y desde otros contenedores, tales como bolsas de cultivo y/o conservación de células u otros contenedores. Como contenedores ilustrativos se incluyen bolsas de infusión, bolsas de solución intravenosa, viales, incluidos los que tienen tapones perforables con una aguja para inyección.

El artículo de fabricación puede incluir además un prospecto o una etiqueta con uno o más datos identificativos y/o instrucciones de uso. En algunos casos, la información o las instrucciones indican que el contenido puede o debe utilizarse para tratar una afección o enfermedad particular, y/o proporcionan instrucciones al respecto. La etiqueta o el prospecto puede indicar que el contenido del artículo fabricado debe utilizarse para tratar la enfermedad o afección. En algunos casos, la etiqueta o el prospecto proporciona instrucciones para tratar a un sujeto, p. ej., al sujeto del que se han obtenido las células, mediante un método que implique la administración de una primera dosis y una o más dosis consecutivas de las células, p. ej., de acuerdo con cualquiera de los casos de los métodos desvelados. En algunos casos, las instrucciones especifican la administración, en una primera dosis, de una dosis unitaria, p. ej., el contenido de un único contenedor individual en el artículo de fabricación, seguida de una o más dosis consecutivas en un momento determinado o dentro de una ventana temporal específica y/o tras la detección de la presencia o ausencia o cantidad o grado de uno o más factores o resultados en el sujeto.

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

En algunos casos, la etiqueta, el prospecto o el envase comprenden un identificador que indica la identidad específica del sujeto del que se obtienen las células y/o al que se van a administrar. En el caso de transferencia autóloga, la identidad del sujeto del que proceden las células es la misma que la identidad del sujeto al que se le van a administrar las células. Por tanto, la información identificativa puede especificar que las células se van a administrar a un paciente concreto, tal como aquel del que proceden originalmente las células. Dicha información puede estar presente en el material y/o en la etiqueta de envasado en forma de código de barras u otro identificador codificado, o puede indicar el nombre y/u otras características identificativas del sujeto.

En algunos casos, el artículo de fabricación incluye uno o más, normalmente una pluralidad, de contenedores que contienen las composiciones que comprenden las células, p. ej., formas farmacéuticas unitarias individuales de las mismas e incluyen además uno o más contenedores adicionales con una composición contenida en ellos que incluye un agente adicional, tal como un agente citotóxico o, de otro modo, terapéutico, por ejemplo, que debe administrarse junto con las células, p. ej., simultánea o secuencialmente, en cualquier orden. Como alternativa o adicionalmente, el artículo de fabricación puede incluir además otro o el mismo contenedor que comprenda un tampón farmacéuticamente aceptable. Puede incluir además otros materiales tales como otros tampones, diluyentes, filtros, tubos, agujas y/o jeringuillas.

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

## V. DEFINICIONES

A menos que se defina de otro modo, se pretende que todos los términos de la técnica, anotaciones y otros términos técnicos y científicos o terminología utilizados en el presente documento tenga el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto con conocimientos habituales en la técnica a la que pertenece la materia reivindicada. En algunos casos, los términos con significados comúnmente entendidos se definen en el presente documento para mayor claridad y/o para tener una referencia inmediata, y la inclusión de dichas definiciones en el presente documento no debe interpretarse necesariamente como una diferencia sustancial con respecto a lo que generalmente se entiende en la técnica.

Como se utiliza en el presente documento, un "sujeto" es un mamífero, tal como un ser humano u otro animal, y normalmente es un ser humano. En algunos casos, el sujeto, p. ej., paciente, al que se administran los polipéptidos inmunomoduladores, las células genomodificadas o las composiciones, es un mamífero, normalmente un primate, tal como un ser humano. En algunos casos, el primate es un mono o un simio. El sujeto puede ser hombre o mujer y puede tener cualquier edad adecuada, incluyendo bebés, jóvenes, adolescentes, adultos y sujetos geriátricos. En algunos casos, el sujeto es un mamífero no primate, tal como un roedor.

Como se utiliza en el presente documento, "tratamiento" (y variaciones gramaticales del mismo tales como "tratar" o "que trata") 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 con el mismo. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero sin limitación, prevenir la aparición o la reaparición de la enfermedad, el alivio de los síntomas, la disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevenir la metástasis, disminuir la velocidad de progresión de la enfermedad, mejorar o paliar el cuadro clínico y la remisión o la mejora del pronóstico. Los términos

no implican la curación completa de una enfermedad o la eliminación completa de cualquier síntoma o efecto(s) en todos los síntomas o resultados.

Como se utiliza en el presente documento, "retrasar el desarrollo de una enfermedad" significa diferir, impedir, ralentizar, retardar, estabilizar, suprimir y/o posponer el desarrollo de la enfermedad (como el cáncer). Este retraso puede ser de duraciones de tiempo variables, dependiendo de los antecedentes de la enfermedad y/o del individuo que se trate. Como es evidente, un retraso suficiente o significativo puede, en efecto, abarcar la prevención, en el sentido de que el individuo no desarrolla la enfermedad. Por ejemplo, un cáncer en estadio avanzado, tal como el desarrollo de metástasis, puede retrasarse.

"Prevención", como se utiliza 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 algunos casos, las células y composiciones desveladas se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para frenar su avance.

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

Una "cantidad eficaz" de un agente, p. ej., una formulación farmacéutica, células, o composición, en el contexto de la administración, se refiere a una cantidad eficaz, a las pautas/cantidades y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr un resultado deseado, tal como un resultado terapéutico o profiláctico.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente, p. ej., de una formulación farmacéutica o de células genomodificadas, se refiere a una cantidad eficaz, a las posologías 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 efecto farmacocinético o farmacodinámico del tratamiento. La cantidad terapéuticamente eficaz puede variar de acuerdo con factores tales como el cuadro clínico, la edad, el sexo y el peso del sujeto, y con los polipéptidos inmunomoduladores o células genomodificadas que se vayan a administrar. En algunos casos, los métodos desvelados implican la administración de los polipéptidos inmunomoduladores, de las células genomodificadas o de las composiciones, en cantidades eficaces, p. ej., cantidades terapéuticamente eficaces.

Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad que es eficaz, a las posologías y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Generalmente, pero no necesariamente, dado que se utiliza una dosis profiláctica en sujetos antes de o en un estadio más temprano de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

La expresión "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que se encuentra en una forma tal 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 administraría la formulación.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a 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.

Como se utiliza en el presente documento, cuando se dice que las posiciones de los nucleótidos o de los aminoácidos "corresponden a" posiciones de nucleótidos o de aminoácidos en una secuencia desvelada, como se expone en el listado de secuencias, se entiende que se refiere a las posiciones de los nucleótidos o de los aminoácidos que se han identificado después del alineamiento con la secuencia desvelada para maximizar la identidad, utilizando un algoritmo de alineamiento estándar, tal como el algoritmo GAP. Alineando las secuencias, se pueden identificar los restos correspondientes, por ejemplo, utilizando como guía restos de aminoácidos conservados e idénticos. En general, para identificar las posiciones correspondientes, las secuencias de aminoácidos se alinean de forma que se obtenga la coincidencia de mayor orden (véase, p. ej.: Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte I, Griffin, A.M. y Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991; Carrillo *et al.* (1988) SIAM J Applied Math 48: 1073).

Como se utiliza en el presente documento, las formas en singular "un", "uno/a", "el" y "la", incluyen las referencias en plural a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Por ejemplo, "un" o "uno/a" significa "al menos uno/a" o "uno/a o más". Se entiende que los aspectos y variaciones descritos en el presente documento incluyen "que consiste" y/o "que consiste esencialmente en" aspectos y variaciones.

A lo largo de la presente divulgación, diversos aspectos de la materia objeto reivindicada se presentan en un formato

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

El término "aproximadamente", como se utiliza en el presente documento, se refiere al intervalo de error habitual para el valor correspondiente, fácilmente conocido por un experto en este **campo técnico**. En el presente documento la referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro incluye (y describe) casos que se refieren de por sí a ese valor o parámetro. Por ejemplo, una descripción que hace referencia a "aproximadamente X" incluye la descripción de "X". En determinados casos, "aproximadamente" un valor indicado se refiere a un valor dentro de  $\pm 25\%$ ,  $\pm 20\%$ ,  $\pm 10\%$ ,  $\pm 5\%$ ,  $\pm 1\%$ ,  $\pm 0,1\%$  o  $\pm 0,01\%$  del valor indicado.

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

Como se utiliza en el presente documento, una afirmación de que una célula o población celular 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, el término se refiere a la presencia de expresión superficial detectada por citometría de flujo, por ejemplo, mediante tinción con un anticuerpo que se une específicamente al marcador y detectando dicho anticuerpo, en donde la tinción es detectable por citometría de flujo a un nivel sustancialmente por encima de la tinción detectada llevando a cabo el mismo procedimiento con un control de isotipo coincidente en condiciones por lo demás idénticas y/o en un nivel sustancialmente similar al de la célula que se sabe que es positiva para el marcador y/o a un nivel sustancialmente superior al de una célula que se sabe que es negativa para el marcador.

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

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

Las expresiones "célula hospedadora", "estirpe celular hospedadora", y "cultivo de células hospedadoras", se usan indistintamente y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células hospedadoras incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen a la célula primaria transformada y a la descendencia derivada de esta, independientemente del número de pases. Es posible que la descendencia no sea completamente idéntica en cuanto al contenido de ácido nucleico a una célula precursora, sino que puede contener mutaciones. En el presente documento se incluye la descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la explorada o seleccionada en la célula transformada originariamente.

## VII. Ejemplos

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

### Ejemplo 1: Evaluación de marcadores de tipo indiferenciado en composiciones de linfocitos T genomodificados que contienen linfocitos T CAR+.

Las composiciones de linfocitos T primarios genomodificados que contienen linfocitos T que expresan receptores

quiméricos para el antígeno (CAR), se produjeron mediante dos procesos paralelos que utilizaron un reactivo estimulador compuesto por perlas paramagnéticas recubiertas de poliestireno con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 adheridos para activar a los linfocitos T antes de la transducción con un vector vírico. En ambos procesos, las células se genomodificaron mediante transducción lentivírica para expresar el mismo CAR anti-BCMA. El CAR contenía un dominio de unión a antígeno scFv específico para BCMA, una región transmembrana CD28, una región de señalización coestimuladora 4-1BB, y un dominio de señalización intracelular procedente de CD3-zeta. Los procesos diferían en su duración y en las condiciones de ampliación de las células. Las composiciones de linfocitos T producidas se evaluaron en busca de marcadores de superficie celular.

En ambos procesos, se seleccionaron distintas composiciones de linfocitos CD4+ y CD8+ a partir de CMSP aisladas de una muestra de leucocitaféresis de un donante humano, y las composiciones celulares seleccionadas se criocongelaron. Las distintas composiciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ se descongelaron posteriormente y se mezclaron en una proporción de 1:1 de linfocitos T CD4+ viables y linfocitos T CD8+ viables. Aproximadamente  $300 \times 10^6$  linfocitos T ( $150 \times 10^6$  linfocitos T CD4+ y  $150 \times 10^6$  linfocitos T CD8+) de la composición celular mixta de entrada se estimularon incubando las células durante 18-30 horas en presencia de perlas conjugadas con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 a una proporción entre perla y célula de 1:1 en medios sin suero. Los medios también contenían IL-2, IL-7 e IL-15 recombinante. Después de la estimulación, las células se lavaron y se resuspendieron en el medio sin suero que contenía aditivos, así como IL-2, IL-7 e IL-15 recombinante.

En un proceso (en lo sucesivo en el presente documento "no ampliado"), las células de la composición celular estimulada se transdujeron después con un vector lentivírico que codifica el CAR anti-BCMA mediante espinoculación. Después de la espinoculación, las células se lavaron y se resuspendieron en el medio sin suero que contenía IL-2, IL-7 e IL-15 recombinante. Las células de las composiciones resuspendidas se incubaron a aproximadamente 37,0 °C en una incubadora. Aproximadamente 96 horas después del inicio de la estimulación, las células se aclararon dos veces en presencia de un campo magnético para eliminar las perlas paramagnéticas conjugadas con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28, y se formularon en una solución que contenía un DMSO al 10 %. La composición celular formulada se transfirió a una bolsa o vial y se conservó a aproximadamente -80 °C.

En otro proceso (en lo sucesivo en el presente documento "ampliado"), después de la incubación, aproximadamente  $100 \times 10^6$  células viables de la composición celular estimulada se concentraron en el medio sin suero que contenía IL-2 recombinante, IL-7 e IL-15 recombinante. Como se ha descrito anteriormente, las células se transdujeron con un vector lentivírico que codifica el mismo CAR anti-BCMA mediante espinoculación a aproximadamente 1600 g durante 60 minutos. Después de la espinoculación, las células se resuspendieron en el medio sin suero que contenía IL-2, IL-7 e IL-15 recombinante, y se incubaron durante aproximadamente 18 a 30 horas a aproximadamente 37 °C. A continuación, las células se cultivaron para su ampliación transfiriéndolas a un biorreactor (p. ej. un biorreactor de movimiento oscilante) en aproximadamente 500 ml del medio ilustrativo sin suero que contenía el doble de la concentración de IL-2, IL-7 e IL-15 tal como se utiliza durante las etapas de incubación y transducción. Cuando se alcanzó una densidad celular viable determinada, se inició la perfusión, donde se sustituyó el medio por una perfusión semicontinua con mezcla continua. Las células se cultivaron al día siguiente en el biorreactor hasta alcanzar una densidad celular umbral de aproximadamente  $3 \times 10^6$  células/ml, que normalmente se produce en un proceso que conlleva 6-7 días de ampliación. Las perlas paramagnéticas conjugadas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 se retiraron de la composición celular mediante exposición a un campo magnético. A continuación, se recogieron las células y se formularon y crioprotegieron como se ha descrito anteriormente.

Las composiciones de linfocitos T producidas a partir de procesos de genomodificación ampliados y no ampliados se tiñeron con anticuerpos que reconocen marcadores de superficie, incluido CD4, CD8, CCR7 y CD27 y se cuantificaron por citometría de flujo. El porcentaje de linfocitos T CD4+CAR+ y CD8+CAR+ positivos tanto para la tinción de CCR7 como de CD27 se muestra en la **FIG. 1A**,

la **FIG. 1B** y la **FIG. 1C** representan el porcentaje de células CCR7+CD27+ con respecto a linfocitos T CD4+CAR+ o CD8+CAR+, respectivamente, en las composiciones de linfocitos T producidas, en comparación con el porcentaje de células CCR7+CD27+ en la composición de entrada antes de la incubación con el reactivo estimulador de microesferas conjugadas con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 (CMAT). Como se muestra, se observó un mayor porcentaje de CCR7+CD27+ en las composiciones de linfocitos T producidas a partir del proceso de genomodificación no ampliado en comparación con el proceso de genomodificación ampliado.

Análisis adicionales de las células generadas por el proceso ampliado a partir de un donante representativo a varios días durante el proceso de fabricación, incluida la activación (AMAT), transducción (XMAT) o en distintos momentos tras el inicio del cultivo (inoc +2, inoc +4 o inoc +5), demuestran que la ampliación de las células se asocia a un fenotipo más diferenciado, tal como se determina por la disminución del porcentaje de células CCR7+ CD27+ (**FIG. 1D**).

## **Ejemplo 2 Relación del fenotipo de tipo indiferenciado con la respuesta del donante a los linfocitos T que expresan CAR**

Se generaron composiciones de linfocitos T terapéuticas ilustrativas que contenían linfocitos T autólogos que expresaban un receptor quimérico para el antígeno (CAR) específico para CD19. El CAR anti-CD19 contenía un scFv



anti-CD19 procedente de un anticuerpo murino (la región variable procedía de FMC63), un espaciador procedente de inmunoglobulina, un dominio transmembrana procedente de CD28, una región coestimuladora procedente de 4-1BB, y un dominio de señalización intracelular CD3-zeta.

- 5 Para la generación de composiciones celulares para administración, se aislaron células autólogas de los sujetos mediante leucocitaféresis. Las muestras de la leucocitaféresis se sometieron a un proceso de generación de células que expresaban CAR. El proceso implicó lavar las células utilizando un lavado automatizado y la selección basada en inmunofluorescencia para la purificación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, dando lugar a dos composiciones, enriquecidas para CD8<sup>+</sup> (en las que una mediana del 99 %, intervalo intercuartílico (IIC) del 98-100 %, de células eran células CD8<sup>+</sup>) y CD4<sup>+</sup> (en las que una mediana del 99 %, IIC del 99-100 %, de células eran células CD4<sup>+</sup>), respectivamente.

Las células de las composiciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> enriquecidas se activaron con perlas paramagnéticas anti-CD3/anti-CD28 y, a continuación, se sometieron por separado a transducción lentivírica con un vector que codifica un CAR anti-CD19 con un dominio coestimulador 4-1BB. A continuación, las poblaciones transducidas se incubaron por separado en presencia de reactivos estimulantes para la ampliación celular. Las células CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> ampliadas se formularon y crioconservaron por separado y se conservaron antes de su administración. Para minimizar las variaciones, entre lotes y/o composiciones celulares procedentes de diferentes pacientes, tales como los que tienen diferentes atributos de paciente, en parámetros indicativos de la salud celular, las células se mantuvieron a volúmenes constantes en todos los lotes. Los productos celulares presentaban un estrecho intervalo de concentraciones de células viables (basado en una evaluación de las composiciones celulares de un grupo de sujetos, CD8<sup>+</sup>: mediana  $31 \times 10^6$  células/ml, IIC  $28-40 \times 10^6$  células/ml, N=38; CD4<sup>+</sup>: mediana  $35 \times 10^6$  células/ml, IIC  $31-40 \times 10^6$ , N=36).

La composición terapéutica de linfocitos T CAR<sup>+</sup> descrita anteriormente se administró a sujetos con linfoma no hodgkiniano (LNH) agresivo recidivante o resistente (R/R) en un estudio clínico. Específicamente, a una cohorte de sujetos humanos adultos con LNH R/R, incluyendo linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBGB) *de novo* o transformado desde linfoma indolente (NOS), linfoma de linfocitos B de grado alto (incluye doble/triple impacto), DLBGB transformado desde leucemia linfocítica crónica (LLC) o linfomas de la zona marginal (LZM), linfoma mediastínico primario de linfocitos b grandes (LMPLBG) y linfoma folicular de grado 3b (LFG3B), se le administraron composiciones de linfocitos T que expresaban CAR anti-CD19. Los resultados se evaluaron por separado con respecto a un subconjunto básico de sujetos dentro de la cohorte completa (excluidos aquellos sujetos con un estado funcional deficiente (ECOG 2), DLBGB transformado desde linfomas de la zona marginal (LZM) y/o leucemia linfocítica crónica (LLC, de Richter), y excluidos aquellos sujetos con linfoma mediastínico primario de células b grandes (LMPCBG), y linfoma folicular de grado 3b (LFG3B) (cohorte principal)). La cohorte principal incluía sujetos con DLBGB, NOS y linfoma folicular transformado (LFT) o linfoma de linfocitos B de grado alto (doble/triple impacto) o linfoma de linfocitos B de grado alto, con reordenamientos de MYC y BCL2 y/o BCL6 con histología de DLBGB (doble/triple impacto) y con un estado de rendimiento del Grupo Oncológico Cooperativo de la Costa Este (ECOG PS, *Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status*) de 0 o 1. El análisis en este punto temporal presentado en este ejemplo se basa en la evaluación de un total de 91 sujetos de la cohorte completa (88 (65 de la cohorte CORE) evaluados en cuanto a respuesta y 91 (67 de la cohorte CORE) evaluados en cuanto a seguridad) a los que se les había administrado los linfocitos que expresaban CAR anti-CD19.

Las composiciones celulares crioconservadas que contenían células que expresaban CAR anti-CD19 se descongelaron antes de la administración intravenosa. La dosis de linfocitos T terapéuticos se administró como una composición celular definida administrando la población de células CD4<sup>+</sup> CAR<sup>+</sup> formulada y la población de células CD8<sup>+</sup> CAR<sup>+</sup> formulada, administradas por separado a una proporción específica de aproximadamente 1:1. A los sujetos se les administró una dosis única o doble de linfocitos T que expresaban CAR (cada dosis única mediante infusiones distintas de linfocitos T que expresaban CAR CD4<sup>+</sup> y linfocitos T que expresaban CAR CD8<sup>+</sup>, respectivamente) de la siguiente manera: una dosis única de nivel de dosis 1 (ND1) que contenía  $5 \times 10^7$  linfocitos T totales que expresaban CAR, o una dosis única de nivel de dosis 2 (ND2) que contenía  $1 \times 10^8$  linfocitos T totales que expresaban CAR. En algunos casos, a los sujetos se les administró una dosis doble de ND1 en la que cada dosis se administró con un intervalo de diferencia de aproximadamente catorce (14) días, administrada el día 1 y el día 14, incluido un sujeto que involuntariamente recibió dos dosis de ND2 mediante la pauta de dos dosis, debido a un error de posología. El nivel de dosis y los números específicos de subconjuntos de linfocitos T de la composición administrada a ND1 y a ND2, se exponen en la **Tabla E1**. En la cohorte principal, se administró un ND1 a 34 sujetos y un ND2 a 27 sujetos.

**Tabla E1. Nivel de dosis y número específico de subconjuntos de linfocitos T de las composiciones celulares que contienen linfocitos T CAR anti-CD19**

Nivel de dosis	Dosis de linfocito T auxiliar (T <sub>H</sub> ) (CD4 <sup>+</sup> CAR <sup>+</sup> )	Dosis de linfocito T citotóxico (T <sub>C</sub> ) (CD8 <sup>+</sup> CAR <sup>+</sup> )	Dosis total de linfocito T (CD3 <sup>+</sup> CAR <sup>+</sup> )
1	$25 \times 10^6$	$25 \times 10^6$	$50 \times 10^6$
2	$50 \times 10^6$	$50 \times 10^6$	$100 \times 10^6$

La **tabla E2** muestra la respuesta global y los resultados de seguridad de toda la cohorte y de la cohorte principal a los dos niveles de dosis. La tasa de respuesta objetiva (TRO) fue del 74 %, incluido un 52 % de sujetos que mostraron

una respuesta completa (RC). La incidencia de cualquier grado de síndrome de liberación de citocinas (CRS) fue del 35 %, con un 1 % de CRS grave; y la incidencia de cualquier grado de neurotoxicidad (NT) fue del 19 %, con un 1 % de NT grave.

<b>Tabla E2. Respuesta y seguridad después de la administración de células CAR<sup>+</sup></b>				
	<b>COMPLETA</b>	<b>PRINCIPAL</b>		
	<b>Todos los niveles de dosis</b>	<b>Todos los niveles de dosis<sup>a</sup></b>	<b>ND1</b>	<b>ND2</b>
<b>Mejor respuesta global (MRG), n<sup>b</sup></b>	88	65	34	27
TRO, % (IC del 95 %)	74 (63,83)	80(68, 89)	77 (59,89)	82 (62, 94)
RC, % (IC del 95 %)	52 (41,63)	55(43, 68)	47 (30, 65)	63 (42, 81)
<b>Seguridad, n<sup>c</sup></b>	91	67	34	29
Cualquier CRS, % (IC del 95 %)	35 (25, 46)	36 (24, 48)	41 (25, 59)	24 (10, 44)
sCRS (grado 3-4), % (IC del 95 %)	1 (0, 6)	1 (0, 8)	38 (0, 15)	0
Cualquier NT, % (IC del 95 %)	19 (11,28)	21 (12, 33)	24 (11, 41)	17 (6, 36)
sNT(grado 3-4), % (IC del 95 %)	12 (6, 21)	15 (7, 26)	21 (9, 38)	7 (1, 23)
<sup>a</sup> Cuatro pacientes tratados con ND1D (nivel de dosis 1, pauta de dos dosis) con resultados similares.				
<sup>b</sup> Incluye pacientes con acontecimiento de EP, muerte, o exploraciones de reestadificación a los 28 días. Un paciente no tenía exploraciones de reestadificación disponibles.				
<sup>c</sup> Incluye a todos los sujetos que hayan recibido al menos una dosis de producto celular que exprese CAR conforme 28 días antes de la fecha de resumen de datos o hayan fallecido.				

5

#### **A. Asociación entre atributos celulares de los linfocitos T que expresan CAR anti-CD19 y la respuesta**

Se evaluó la relación entre determinados atributos fenotípicos de los linfocitos T CAR<sup>+</sup> en las composiciones terapéuticas y los parámetros asociados a los resultados de la respuesta clínica. Las correlaciones entre el fenotipo de memoria en la composición y la función se tradujeron en una correlación positiva entre la composición del subconjunto de memoria central y el pico de ampliación *in vivo* de células CAR<sup>+</sup> ( $p=0,42$ ,  $P=0,002$ ), y la supervivencia sin progresión (SSP) (estimación de supervivencia de Kaplan-Meier,  $P=0,0164$ ) que se observaron. Las **FIGS. 2A-2D** muestran las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de los sujetos a los que se administraron composiciones de linfocitos T CAR<sup>+</sup>, divididos en grupos a los que se administraron composiciones que contenían una frecuencia de linfocitos CCR7<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> CAR<sup>+</sup> entre linfocitos T CD4<sup>+</sup> CAR<sup>+</sup> (**FIG. 2A** para la supervivencia sin progresión, **FIG. 2C** para la duración de la respuesta) y entre linfocitos T CD8<sup>+</sup> CAR<sup>+</sup> (**FIG. 2B** para la supervivencia sin progresión, **FIG. 2D** para la duración de la respuesta) que está por encima o por debajo de un determinado nivel umbral. Se observó que un mayor número de células de memoria CCR7<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> en la composición, se correlacionaba con una mayor supervivencia sin progresión.

20

#### **Ejemplo 3: Evaluación de la clonalidad de linfocitos T utilizando métodos de secuenciación y análisis**

Se evaluaron las composiciones de linfocitos T para determinar la abundancia clonal de linfocitos T, utilizando secuenciación unicelular de pares de receptores de linfocitos T (TCR), antes y después de la genomodificación para expresar un receptor quimérico para el antígeno (CAR).

25

Se aislaron linfocitos T autólogos de los sujetos mediante leucocitaféresis por selección basada en inmutafinidad para la purificación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, dando lugar a dos composiciones, enriquecidas para linfocitos T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>, respectivamente. Las células de las composiciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> enriquecidas se activaron con perlas paramagnéticas anti-CD3/anti-CD28 y, a continuación, se sometieron por separado a transducción lentivírica con un vector que codifica un CAR anti-CD19. El CAR anti-CD19 contenía un scFv anti-CD19 procedente de un anticuerpo murino (la región variable procedía de FMC63), un espaciador procedente de inmunoglobulina, un dominio transmembrana procedente de CD28, una región coestimuladora procedente de 4-1BB, y un dominio de señalización intracelular CD3-zeta. A continuación, las poblaciones transducidas se incubaron por separado en presencia de reactivos estimulantes para la ampliación celular. Las composiciones de CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> ampliadas que contenían linfocitos T que expresaban CAR se formularon y crioconservaron por separado y se almacenaron.

Se evaluó la clonalidad de linfocitos T de las composiciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> aislados antes de la genomodificación (CMAT) y de las composiciones de linfocitos T CAR<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> terapéuticos después de la genomodificación mediante el proceso descrito anteriormente. Para evaluar la clonalidad de los linfocitos T, las células se sometieron a secuenciación unicelular del TCR con emparejamiento de  $\alpha\beta$ , en general, como se describe en los documentos WO2016044227, WO2016176322 y WO2012048340. Basándose en la secuenciación unicelular con

40

código de barras de los genes TCR, se determinó la clonalidad de los linfocitos T y la diversidad de los clones identificados en una población celular. En algunos casos, el índice de Shannon se utilizó como un umbral para filtrar clones ("clonalidad ajustada por Shannon"), que preserva las relaciones entre muestras al tiempo que elimina el ruido de las mismas. Véase, Chaara *et al.* (2018) Front Immunol 9:1038).

La **FIG. 3** muestra la clonalidad de cada muestra después de aplicar el índice de Shannon. Como se muestra en la **FIG. 3**, la clonalidad de las células CD4 y CD8 difería entre las composiciones de linfocitos T antes y después de la genomodificación, mostrando las composiciones de linfocitos T CAR+ genomodificadas una clonalidad reducida en comparación con la de los linfocitos T en las composiciones antes del inicio del proceso de genomodificación de las células.

Las composiciones de linfocitos T CAR+ CD4+ y CD8+ terapéuticos después de la genomodificación se clasificaron mediante citometría de flujo por expresión de un factor indicativo de apoptosis, tal como tinción de la superficie con Anexina V (Anexina V-) o escisión de caspasa 3 (que indica células no apoptóticas), y por expresión de diversos marcadores de superficie, incluido CD45RA, CCR7, CD27, CD4 y CD8. El fenotipo de las células se correlacionó con el grado de clonalidad de las mismas. Se observó que, en ambas de las composiciones de linfocitos T CAR+ terapéuticos CD4+ y CD8+, la presencia de células negativas a marcadores apoptóticos que eran CCR7/CD27<sup>-</sup> se correlacionó positivamente en gran medida con la clonalidad de las células en la composición. Asimismo, la presencia de células negativas a marcadores apoptóticos que eran CCR7+ o CCR7+/CD27+ se correlacionó negativamente con la clonalidad de las células en cada una de las composiciones de linfocitos T CAR+ terapéuticos CD4+ y CD8+. Estos resultados son congruentes con la observación de que la clonalidad de las células puede estar inversamente correlacionada con células de tipo indiferenciado, menos diferenciadas, tal como se determina mediante positividad de CCR7 y/o CD27.

La presente invención no pretende limitar su alcance a las realizaciones particulares desveladas, que se desvelan, por ejemplo, para ilustrar diversos aspectos de la invención. Diversas modificaciones de las composiciones y métodos descritos resultarán evidentes a partir de la descripción y enseñanzas del presente documento.

## SECUENCIAS

N. º	SECUENCIA	COMENTARIO
1	ESKYGPPCPPCP	espaciador (bisagra de IgG4) (aa) de <i>Homo sapiens</i>
2	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCTTGCCCT	espaciador (bisagra de IgG4) (nt) de <i>Homo sapiens</i>
3	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKS LSLSLGK	Espaciador bisagra-CH3 de <i>Homo sapiens</i>
4	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVHLQDNLNGKEYKCKVSNKGLP SIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN PENNKTTPFPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS LSLGK	Espaciador bisagra-CH2-CH3 de <i>Homo sapiens</i>
5	RWPESPKAQASSVPTAQPAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEKKKEKEKEEQEER ETKTPCEPSTHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLDKDAHLTWEVAGKV PTGGVEEGLLERHNSGQSQHSRLTLPSLWNAAGTSVTCTLNHPSLFPQRLMALRE PAAQAPVKLSLNLASSDPPAASWLLCEVSGFSPNILLMWLEDQREVNTSGFAP ARPPQPQGSTTFWAWSVLRVPAFPSPQFATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSYVT DH	IgD-bisagra-Fc de <i>Homo sapiens</i>
6	LEGGGEGRGSLTCDGVEENPGPR	T2A artificial
7	MLLVTSLLLCPLPFAFLIIPKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFNCTSI DLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENL EIIIRGRTKQHGFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNCYANTINWKK LFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCGFEPEDCVSCRNVSRGREG VDKCNLLEGEPEFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHC VKTCPAGVMGENTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGGCTGPGLEGCPNGPKIPSLA TGMVGCALLLLVVALGIGLFM	tEGFR artificial
8	FWVLVVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (aminoácidos 153-179 de N.º de registro P10747)
9	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKP FWVLVVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (aminoácidos 114-179 de N.º de registro P10747)
10	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28 (aminoácidos 180-220 de P10747) de <i>Homo sapiens</i>
11	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28 (de LL a GG) de <i>Homo sapiens</i>

(continuación)

N. o	SECUENCIA	COMENTARIO
12	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL	4-1BB (aminoácidos 214-255 de Q07011.1) de <i>Homo sapiens</i>
13	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 zeta de <i>Homo sapiens</i>
14	RVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 zeta de <i>Homo sapiens</i>
15	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 zeta de <i>Homo sapiens</i>
16	RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSI S GDLHILPVAFRGDSFTHTPFLDP QELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNI TSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNCYANTINWKKLFGTSGQTKIISNRGENSCKA TGQVCHALCSPGCGWGPEDCVSCRNVSRGRCVDKCNLLEGEPRFVENSECIQ CHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADA GHVCHLCHPNCTYGTCTGPGLEGCPNKGKIPSIATGMVGALLLLVVALGIGLPM	tEGFR artificial
17	EGRGSLTTCGDVEENPGP	T2A artificial
18	MALPVTALLLPLALLLHA	Péptido señal CD8 alfa
19	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
20	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
21	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
22	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A
23	PGGG- (SGGGG) 5-P- en donde P es prolina, G es glicina y S es serina (cuadro 23, página 68)	enlazador
24	GSADDAKKAADKDGKS	enlazador
25	atgcttctctctgtgacaaagccttctgtctgtgtgagttaccacacccagcattcct cctgatccca	Secuencia señal de la cadena alfa de GMCSFR
26	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP	Secuencia señal de la cadena alfa de GMCSFR
27	Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro	Bisagra
28	ELKTEPLGDTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSC DTPPPCPRCP	Bisagra
29	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro	Bisagra
30	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Bisagra
31	Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Bisagra
32	Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Bisagra
33	Glu Val Val Val Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Bisagra
34	QQGNTLPYT	LC-CDR3 de FMC63
35	RASQDISKYN	L1 de CDR de FMC63
36	SRLHSGV	L2 de CDR de FMC63
37	GNTLPYTFG	L3 de CDR de FMC63
38	DYGVS	H1 de CDR de FMC63
39	VIWGSETTYNSALKS	H2 de CDR de FMC63
40	YAMDYWG	H3 de CDR de FMC63
41	EVKLQESGPGIVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWIGSET TYNSALKSRLTIKDNKSQVFLKMNLSQTDGDTAIIYCAKHYYGGSYAMDYWGQ GTSVTVSS	VH de FMC63

(continuación)

N. º	SECUENCIA	COMENTARIO
42	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHS GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGCKLEIT	VL de FMC63
43	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHS GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGCKLEITGSTSG SGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRK GLEWLGVIWGSETTYNNSALKSRITIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDETAIYYCAKHY YYGGSYAMDYWGQTSVTVSS	scFv de FMC63
44	KASQNVGTNVA	L1 de CDR de SJ25C1
45	SATYRNS	L2 de CDR de SJ25C1
46	QQYNRYPYT	L3 de CDR de SJ25C1
47	SYWMN	H1 de CDR de SJ25C1
48	QIYPGDGDTNYNGKFKG	H2 de CDR de SJ25C1
49	KTISSVDFYFDY	H3 de CDR de SJ25C1
50	EVKLQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRFQGLEWIGQIYPGDG DTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISVVDYFDYW GQGTITVTVSS	VH de SJ25C1
51	DIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNS GVPRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGCKLEIKR	VL de SJ25C1
52	GGGGSGGGGSGGGGS	Enlazador
53	EVKLQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRFQGLEWIGQIYPGDG DTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISVVDYFDYW GQGTITVTVSSGGGGSGGGGSGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGT NVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYF CQQYNRYPYTSGGGCKLEIKR	scFv de SJ25C1
54	HYYYGGSYAMDY	HC-CDR3 de FMC63
55	HTSRLHS	LC-CDR2 de FMC63
56	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	Enlazador
57	gacatccagatgacccagaccacccctcagcctgagcgcagcctggcgacccgggt gaccatcagctgcccggccagccagcagacatcagcaagtacctgaactggatcagc agaagcccgacggcaccgtcaagctgctgactaccacaccagccggctgcacagc ggcgtgcccagccgggttttagcggcagcggctccggcaccgactacagcctgacat ctccaaacctggaacaggaagatatcgccacctacttttgcagcagggcaacacac tgccctacacctttggcgccggaacaaagctggaatcacccgcagcacctccggc agcggcaagcctggcagcggcgagggcagcaccaaagggcgaggtgaagctgcagga aagcggccctggcctggtggccccagccagagcctgagcgtgaacctgcacccgtga gcggcgtgagcctgcccgaactacggcgtgagctggatccggcagccccccaggaag ggcctggaatggctggcgctgactggggcagcagaccactactacaacagcgc cctgaagagccggctgacccatcatcaaggacaacagcaagagccagggtgtcctga agatgaacagcctgcagacccgacacccgcatctactactgcccgaagcactac tactacggcgccagctacgccatggactactggggccagggcaccagcgtgacccgt gagcagc	Secuencia codificante de scFv
58	X1PPX2P	Bisagra
	X1 es glicina, cisteína o arginina	
	X2 es cisteína o treonina	
59	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro	Bisagra

## REIVINDICACIONES

1. Un método para estimular linfocitos T y generar una composición que comprenda linfocitos T que expresen un receptor recombinante genomodificado, comprendiendo el método:

(a) incubar, en condiciones estimulantes, una composición de entrada que comprenda linfocitos T que comprenda una cantidad iniciadora de cultivo de linfocitos T de tipo indiferenciado o de un subconjunto de linfocitos T CD8+ de los mismos, produciendo de este modo una composición estimulada, en donde:

(i) las condiciones estimulantes comprenden la presencia de un reactivo estimulador que comprende un agente primario que es un anticuerpo anti-CD3 y un agente secundario que es un anticuerpo anti-CD28, en donde el reactivo estimulador activa uno o más dominios de señalización intracelular de uno o más componentes de un complejo TCR y/o uno o más dominios de señalización intracelular de una o más moléculas coestimuladoras, generando de este modo una composición estimulada, y en donde el tiempo de estimulación es de entre 2 y 6 días; y

(ii) la cantidad iniciadora de cultivo de linfocitos T de tipo indiferenciado o de un subconjunto de linfocitos T CD8+ de los mismos es o es de al menos  $2 \times 10^8$  de los linfocitos T de tipo indiferenciado o de un subconjunto de linfocitos T CD8+ de los mismos, en donde los linfocitos T de tipo indiferenciado o los linfocitos T CD8+ de tipo indiferenciado son CD27+ y CCR7+; y

(b) introducir en la composición celular estimulada un ácido nucleico que codifique un receptor recombinante genomodificado, en donde el método genera de este modo una composición de salida que comprende linfocitos T que expresan el receptor recombinante genomodificado, en donde la introducción se realiza durante al menos una parte de la incubación o se realiza después de la incubación.

2. El método de la reivindicación 1, en donde los linfocitos T de tipo indiferenciado o los linfocitos T CD8+ de tipo indiferenciado son CD45RA+, CD27+, CCR7+ y CD45RO-.

3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde los linfocitos T comprenden linfocitos T de tipo indiferenciado y linfocitos T de tipo no indiferenciado, y las condiciones estimulantes inducen preferentemente la ampliación o proliferación de los linfocitos T de tipo indiferenciado en comparación con los linfocitos T de tipo no indiferenciado en la composición estimulada.

4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la cantidad iniciadora de cultivo de linfocitos T de tipo indiferenciado o de un subconjunto de linfocitos T CD8+ de los mismos:

(i) es de  $2 \times 10^8$  a  $5 \times 10^8$  o de  $2 \times 10^8$  a  $4 \times 10^8$  de los linfocitos T de tipo indiferenciado o de un subconjunto de linfocitos T CD8+ de los mismos;

(ii) es o es de al menos  $4 \times 10^8$  de los linfocitos T de tipo indiferenciado o de un subconjunto de linfocitos T CD8+ de los mismos; y/o

(iii) en donde la cantidad iniciadora de cultivo es una cantidad de linfocitos T CD8+ de tipo indiferenciado.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde los linfocitos T de tipo indiferenciado o los linfocitos T CD8+ de tipo indiferenciado:

(i) son positivos en superficie para un marcador de activación de linfocitos T seleccionado del grupo que consiste en CD45RA, CD27, CD28 y CCR7; y/o

son negativos en superficie para un marcador seleccionado del grupo que consiste en CD25, CD45RO, CD56, CD62L, KLRG1; y/o

tienen baja expresión de CD95; y/o

son negativos para la expresión intracelular de una citocina seleccionada del grupo que consiste en IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10;

(ii) son positivos en superficie para un marcador de activación de linfocitos T seleccionado del grupo que consiste en CD45RA, CD27, CD28 y CCR7; y/o

son negativos en superficie para un marcador seleccionado del grupo que consiste en CD45RO, CD56, KLRG1; y/o

tienen baja expresión de CD95.

6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en donde los linfocitos T de tipo no indiferenciado:

(i) son negativos en superficie para un marcador de activación de linfocitos T seleccionado del grupo que consiste en CD45RA, CD27, CD28 y CCR7; y/o

son positivos en superficie para un marcador seleccionado del grupo que consiste en CD25, CD45RO, CD56, CD62L, KLRG1 y perforina; y/o

son positivos para la expresión intracelular de una citocina seleccionada del grupo que consiste en IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10; y/o

tienen alta expresión de CD95; y/o

(ii) son CD45RA-, CD27-, CCR7- y/o CD45RO+.

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde antes de la incubación, las células de la composición de entrada no se han sometido, y no se someten, a una etapa de selección basada en un marcador endógeno de la superficie de linfocitos T que diferencia entre linfocitos T de tipo indiferenciado y linfocitos T de tipo no indiferenciado.

8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el receptor recombinante es capaz de unirse a un antígeno diana que está asociado a, es específico para, y/o se expresa en, una célula o tejido de una enfermedad, un trastorno o una afección; opcionalmente en donde:

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

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

(iii) el antígeno diana se selecciona entre integrina  $\alpha v \beta 6$  (integrina  $\alpha v \beta 6$ ), antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA), anhidrasa carbónica 9 (CA-CAIX), Her2/neu (tirosina cinasa receptora erbB2), L1-CAM, B7-H3, B7-H6, anhidrasa carbónica 9 (CA9, también conocida como CAIX o G250), un antígeno del cáncer de testículo, antígeno 1B de cáncer/testículo (CTAG, también conocido como NY-ESO-1 y LAGE-2), antígeno carcinoembrionario (CEA) y antígeno de superficie de la hepatitis B, receptor anti-folato, una ciclina, ciclina A2, ligando 1 de quimiocinas con motivo C-C (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, condroitín sulfato proteoglicano 4 (CSPG4), proteína del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), glucoproteína 2 epitelial (EPG-2), glucoproteína 40 epitelial (EPG-40), efrina B2, receptor de efrina A2 (EPHA2), erb-B2, erb-B3, erb-B4, dímeros erbB, mutación del receptor del factor de crecimiento epidérmico de tipo III (EGFR vIII), proteína de unión a folato (FBP), receptor Fc de tipo 5 (FCRL5; también conocido como receptor Fc homólogo 5 o FCRH5), receptor de acetilcolina fetal (AChR fetal), una proteína de unión a folato (FBP), receptor alfa de folato, gangliósido GD2, GD2 O-acetilado (OGD2), gangliósido GD3, glipicano-3 (GPC3, Receptor 5D acoplado a proteína G (GPRC5D), Her2/neu (tirosina cinasa receptora erbB2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), dímeros erbB, antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA) humano, antígeno de superficie de la hepatitis B, antígeno leucocitario humano A1 (HLA-A1), antígeno leucocitario humano A2 (HLA-A2), receptor IL-22 alfa (IL-22R-alfa), IL-13R-alfa2 (IL-13R $\alpha$ 2), receptor del dominio de inserción de cinasa (kdr), cadena ligera kappa, Lewis Y, molécula L1 de adhesión celular (L1-CAM), epítipo CE7 de L1-CAM, miembro A de la familia 8 que contiene repeticiones ricas en leucina (LRRC8A), Lewis Y, antígeno asociado a melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, mesotelina (MSLN), c-Met, citomegalovirus (CMV) murino, mucina 1 (MUC1), MUC16, ligandos citolíticos naturales del miembro D de grupo 2 (NKG2D), melan A (MART-1), molécula de adhesión celular neural (NCAM), antígeno oncofetal, antígeno preferentemente expresado del melanoma (PRAME), receptor de progesterona, un antígeno específico de próstata, antígeno prostático de células madre (PSCA), antígeno prostático específico de membrana (PSMA), receptor 1 huérfano similar a tirosina cinasa receptora (ROR1), survivina, glucoproteína trofoblástica (TPBG también conocida como 5T4), glucoproteína 72 asociada a tumores (TAG72), proteína 1 relacionada con tirosinasa (TRP1, también conocida como TYRP1 o gp75), proteína 2 relacionada con tirosinasa (TRP2, también conocida como dopacromo tautomerasa, dopacromo delta-isomerasa o DCT), receptor alfa de folato, 8H9, antígeno dual, glucoproteína 100 (gp100), receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-R2), receptor de estrógenos, receptor de progesterona, Tumor de Wilms 1 (WT-1), un antígeno específico de patógeno o expresado por patógeno y un antígeno asociado a una etiqueta universal.

9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el receptor recombinante es o comprende un receptor funcional de antígeno que no es un TCR o un TCR o fragmento de unión a antígeno del mismo, y/o en donde el receptor recombinante es un receptor quimérico para el antígeno (CAR).

10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el receptor recombinante comprende

(i) un dominio extracelular que comprende un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno diana; opcionalmente, en donde el dominio de unión a antígeno es o comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo, que opcionalmente es un fragmento monocatenario; y

(ii) un dominio de señalización intracelular que comprende un ITAM; opcionalmente, en donde el dominio de señalización intracelular es o comprende un dominio de señalización intracelular de una cadena CD3, opcionalmente una cadena CD3-zeta (CD3 $\zeta$ ), o una porción de señalización de la misma.

11. El método de la reivindicación 10, en donde la región de señalización intracelular comprende además una región de señalización coestimuladora;

opcionalmente, en donde la región de señalización coestimuladora comprende un dominio de señalización intracelular de una molécula coestimuladora de linfocitos T o una porción de señalización de la misma; y/o en donde la región de señalización coestimuladora comprende un dominio de señalización intracelular de un CD28, un 4-1BB o un ICOS o una porción de señalización del mismo.

- 5 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el agente primario y/o el agente secundario están presentes en la superficie de un soporte sólido.
- 10 13. El método de la reivindicación 12, en donde el soporte sólido es, o comprende, una perla.
- 10 14. El método de la reivindicación 13, en donde la perla:
- 15 (i) comprende un diámetro superior a 3,5  $\mu\text{m}$  pero no superior a 9  $\mu\text{m}$  o no superior a 8  $\mu\text{m}$  o no superior a 7  $\mu\text{m}$  o no superior a 6  $\mu\text{m}$  o no superior a 5  $\mu\text{m}$ ;
- 15 (ii) comprende un diámetro de 4,5  $\mu\text{m}$
- 15 (iii) es inerte;
- 15 (iv) es o comprende una superficie de poliestireno; y/o
- 15 (v) comprende un núcleo magnético o superparamagnético.
- 20 15. El método de la reivindicación 13 o la reivindicación 14, en donde las condiciones estimulantes comprenden incubar las células con una proporción entre perlas y células
- 25 (i) que es de 1:1 a 10:1, de 1:1 a 8:1, de 1:1 a 6:1, de 1:1 a 4:1, de 1:1 a 3:1, de 2:1 a 4:1, de 2:1 a 3:1, de 1:1 a 2:1, de 4:1 a 10:1, de 4:1 a 8:1, de 4:1 a 6:1, de 6:1 a 10:1, de 6:1 a 8:1, de 8:1 a 10:1, de 1:1 a 1:10, de 1:1 a 1:8, de 1:1 a 1:6, de 1:1 a 1:4 o de 1:2 a 1:3,
- 25 (ii) en donde la proporción entre perlas y células es de 3:1; y/o
- 25 (iii) en donde la proporción entre perlas y células es de 1:1.
- 30 16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde:
- 30 (i) los linfocitos T comprenden células CD4+ y/o CD8+;
- 30 (ii) los linfocitos T comprenden linfocitos T CD4+ y CD8+, y la proporción entre linfocitos T CD4+ y CD8+ está entre 2:1 y 1:5;
- 35 (iii) los linfocitos T comprenden linfocitos T CD4+ y CD8+ y la proporción entre células CD4+ y células CD8+ es de 1:1, 1:2, 2:1, 1:3 o 3:1;
- 35 (iv) los linfocitos T de tipo indiferenciado comprenden linfocitos T CD4+ de tipo indiferenciado y/o linfocitos T CD8+ de tipo indiferenciado; y/o
- 35 (v) los linfocitos T de tipo indiferenciado son policlonales.
- 40 17. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en donde las condiciones estimulantes: no comprenden N-acetilcisteína (NAC); o no comprenden IL-15 y/o IL-7.
- 45 18. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en donde las condiciones estimulantes dan como resultado o inducen la muerte de linfocitos T de tipo no indiferenciado o de una subpoblación de los mismos, y/o en donde las condiciones estimulantes dan como resultado la muerte celular inducida por activación (MCI) de linfocitos T de tipo no indiferenciado o de una subpoblación de los mismos.
- 50 19. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en donde la introducción comprende la transducción con un vector vírico que comprende un ácido nucleico que codifica el receptor recombinante; opcionalmente, en donde el vector vírico es un vector retrovírico y/o en donde el vector vírico es un vector lentivírico o un vector gammaretrovírico.
20. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-19, en donde la composición estimulada es más policlonal o multiclonal en comparación con la composición de entrada.



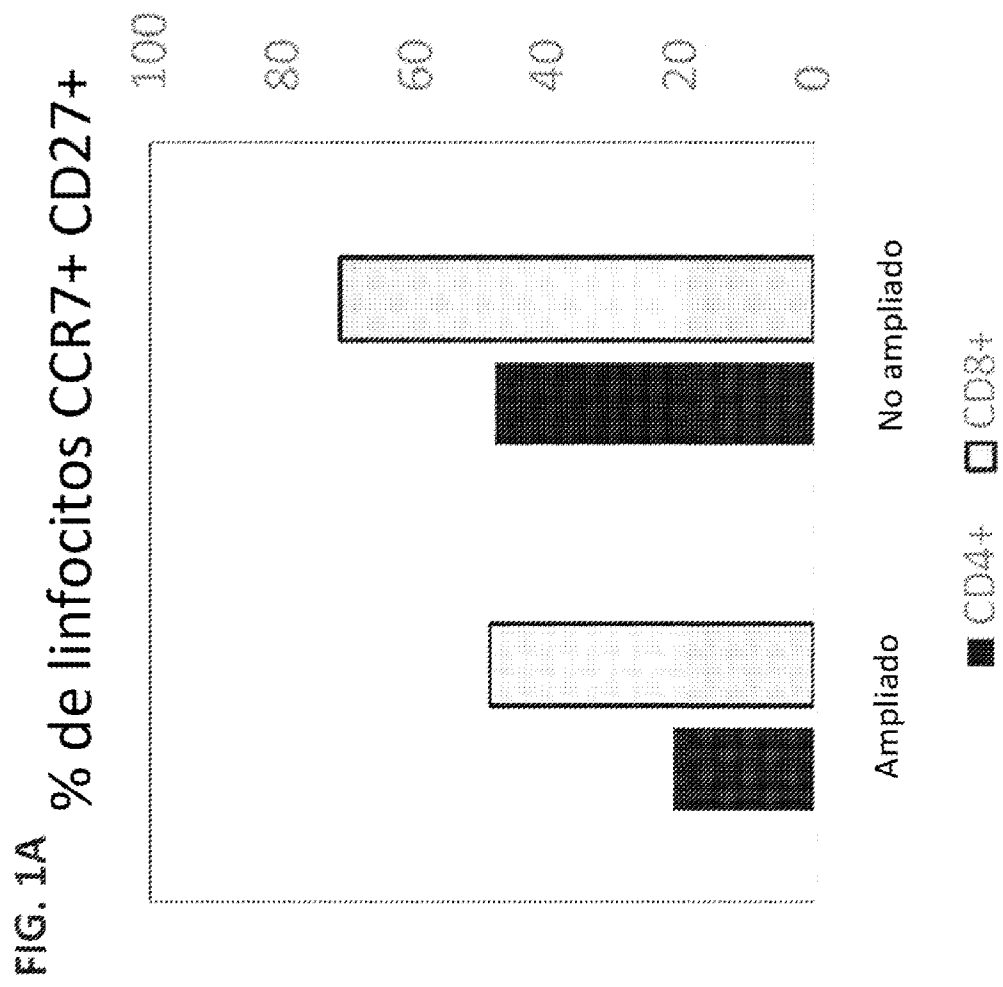


FIG. 1B

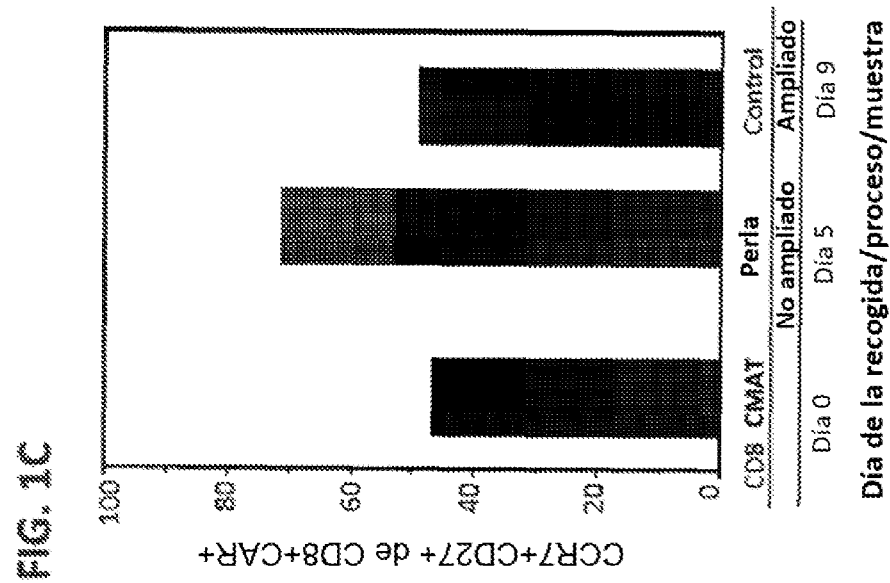
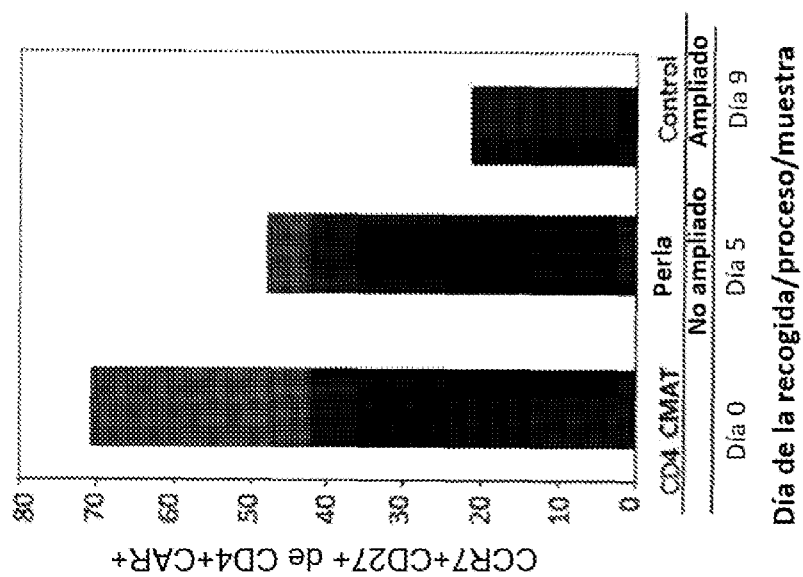


FIG. 1D

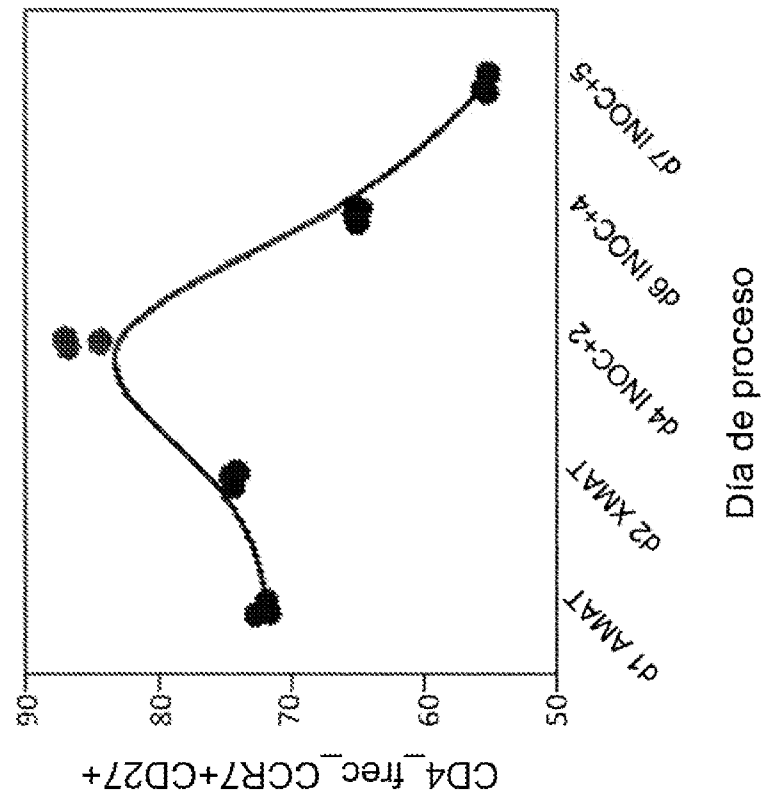


FIG. 2A

CD4+ CAR+

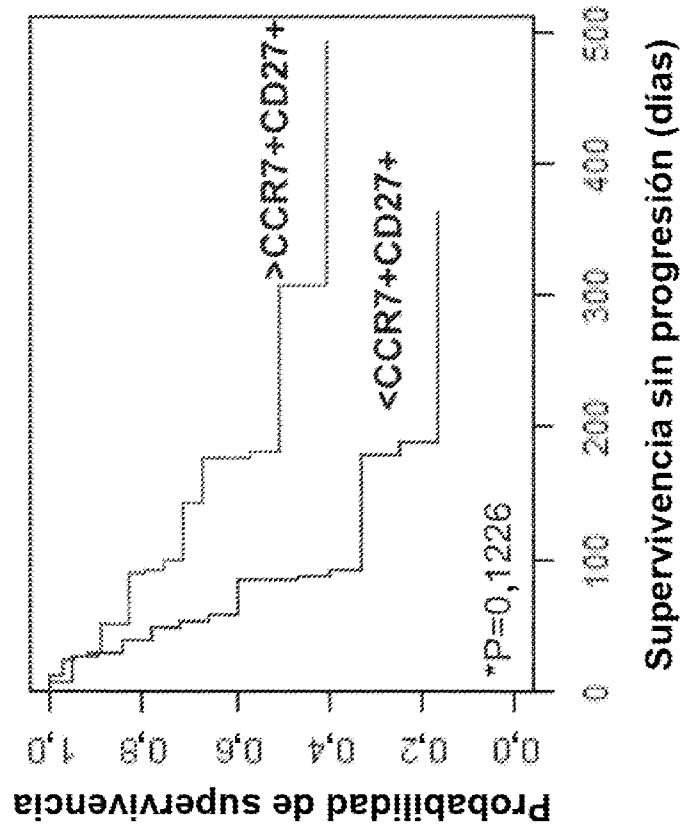


FIG. 2B

CD8+ CAR+

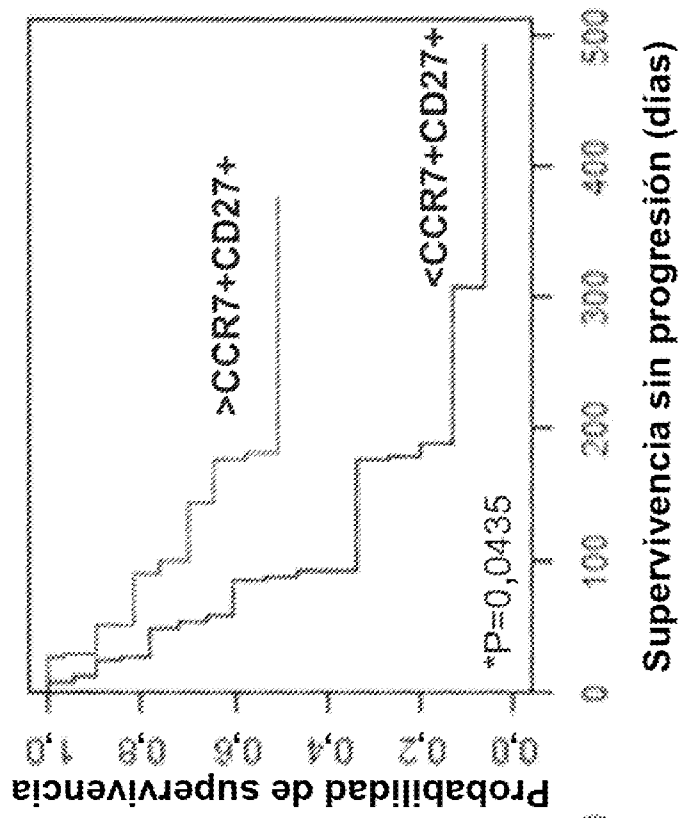


FIG. 2C

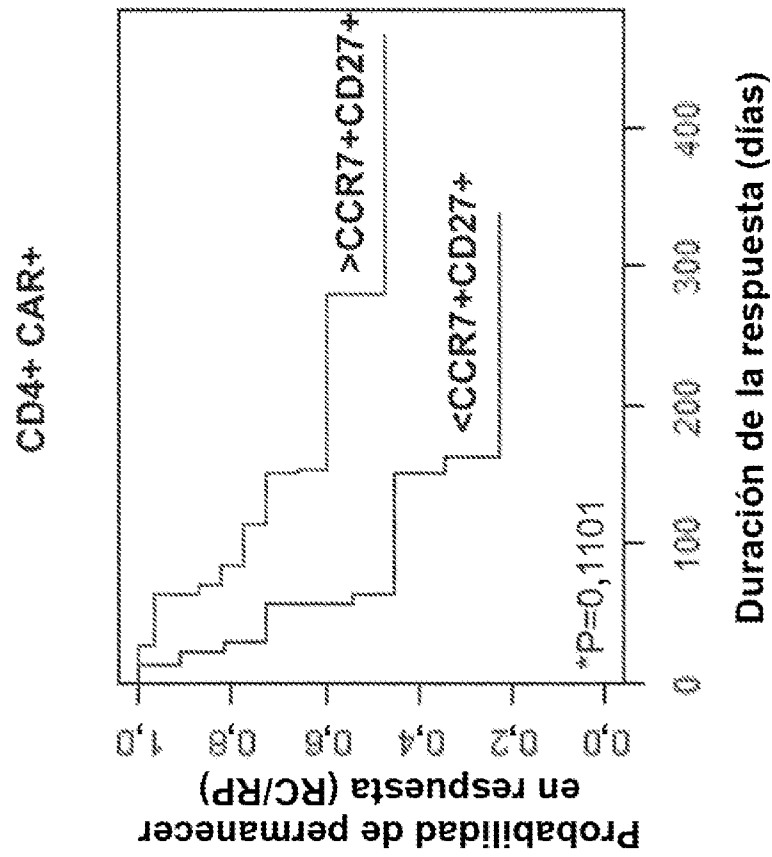


FIG. 2D

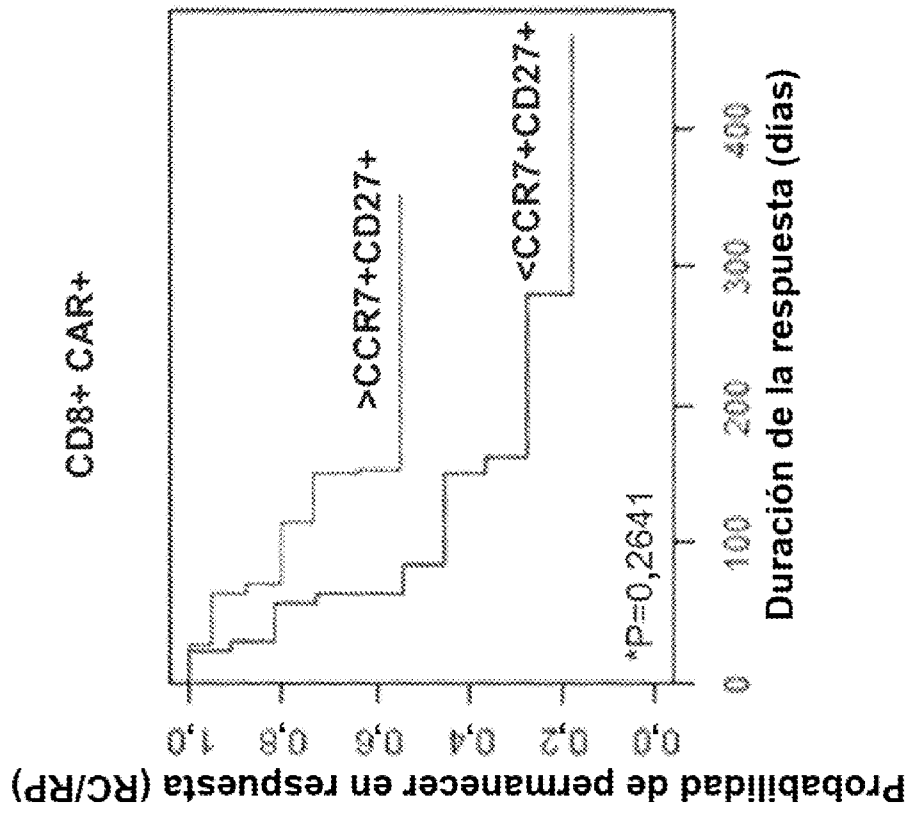


FIG. 3

