

CAPÍTULO REIVINDICATORIO MODIFICADO

(Modificaciones Voluntarias)

1. Un método de fabricación de una célula efectora inmune o una población de células efectoras inmunes que expresan un CAR que se une a CD19 (una célula que expresa CAR19), que comprende:

poner en contacto la célula efectora inmune o población de células efectoras inmunes con un inhibidor de tirosina quinasa de Bruton (BTK) *in vitro*; en donde el inhibidor de BTK se selecciona de: ibrutinib, GDC-0834, RN-486, CGI-560, CGI-1764, HM-71224, CC-292, ONO-4059, CNX-774, o LFM-A13 e

introducir un ácido nucleico que codifica una molécula de CAR19 en la célula efectora inmune o población de células efectoras inmunes bajo condiciones tales que la molécula de CAR19 se expresa, en donde el paso de introducir comprende la transducción del ácido nucleico que codifica una molécula de CAR19 en la célula efectora inmune o población de células efectoras inmunes.

2. El método de fabricación de la Reivindicación 1, en el que la célula efectora inmune es una célula T o célula NK, o en el que la población de células efectoras inmunes incluye células T, células NK, o ambas.

3. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 2, que comprende poner en contacto la célula efectora inmune o población de células efectoras inmunes con el inhibidor de BTK por 10-20, 20-30, 30-40, 40-60, o 60-120 minutos y posteriormente eliminar la mayoría o todo el inhibidor de quinasa de la célula efectora inmune o población de células efectoras inmunes.

4. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3, en el que el inhibidor de quinasa se añade en cualquiera de los siguientes:

(i) después de que la célula efectora inmune o la población de células efectoras inmunes es cosechada;

(ii) antes de que la célula efectora inmune o la población de células efectoras inmunes es estimulada;

(iii) después de que la célula efectora inmune o la población de células efectoras inmunes es estimulada;

(iv) antes de que la célula efectora inmune o la población de células efectoras inmunes es transducida;

- (v) después de que la célula efectora inmune o la población de células efectoras inmunes es transducida; o
 - (vi) antes de la administración de las células a un sujeto.
5. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4, en el que el inhibidor de BTK es ibrutinib.
6. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5, que comprende además la depleción de células T reguladoras a partir de la población de células efectoras inmunes, en donde las células T reguladoras comprenden células CD25+.
7. Un método de fabricación de una célula efectora inmune o una población de células efectoras inmunes que expresan un CAR que se une a CD19 (una célula que expresa CAR19), que comprende:
- proporcionar una célula efectora inmune o una población de células efectoras inmunes que comprenden un ácido nucleico que codifica una molécula de CAR19 (una célula o población de células que expresa CAR19); y
 - poner en contacto la célula o población de células que expresa CAR19 con un inhibidor de tirosina quinasa de Bruton (BTK).
8. El método de fabricación de la Reivindicación 7, en donde el inhibidor BTK se selecciona entre ibrutinib, GDC-0834, RN-486, CGI-560, CGI-1764, HM-71224, CC-292, ONO-4059, CNX-774, o LFM-A13.
9. El método de fabricación de la Reivindicación 7 u 8, en donde poner en contacto la célula efectora inmune o la población de células efectoras inmunes con el inhibidor BTK ocurre *in vitro*.
10. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9, en donde la molécula de CAR19 comprende un dominio de unión anti-CD19, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular.
11. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9, en donde la molécula de CAR19 comprende un dominio de unión anti-CD19 comprende una cadena ligera de la región 1 determinante de complementariedad (LC CDR1), una cadena ligera de la región 2 determinante de complementariedad (LC CDR2), una cadena ligera de la región 3 determinante de complementariedad (LC CDR3), una cadena pesada de la región 1 determinante de complementariedad (HC CDR1), una cadena pesada de la región 2

determinante de complementariedad (HC CDR2), y una cadena pesada de la región 3 determinante de complementariedad (HC CDR3) de un dominio de unión anti-CD19.

12. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9, en donde el dominio de unión anti-CD19 comprende una cadena ligera de la región variable murina de la Tabla 7, una cadena pesada de la región variable murina de la Tabla 7, o ambas.

13. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9, en donde el dominio de unión anti-CD19 comprende la LC CDR1 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, la LC CDR2 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26, y la LC CDR3 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27.

14. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9, en donde el dominio de unión anti-CD19 comprende la HC CDR1 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19, la HC CDR2 de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 20-23, y la HC CDR3 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24.

15. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9, en donde el dominio de unión anti-CD19 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59.

16. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9, en donde el dominio de unión anti-CD19 es un dominio de unión anti-CD19 humanizado.

17. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9, en el que el dominio de unión anti-CD19 humanizado comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre: la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12.

18. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9, en donde el dominio de unión anti-CD19 humanizado es un scFv que comprende una región variable de cadena ligera unida a una variable de cadena pesada a través de un enlazador, por ejemplo, en el que el enlazador comprende una secuencia de SEQ ID NO: 53.

19. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 10 a 18, en donde la molécula de CAR comprende un dominio transmembrana de una proteína seleccionada entre: la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, epsilon CD3, CD45, CD4,

CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 o CD154.

20. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 10 a 18, en donde el dominio transmembrana comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.

21. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 10 a 18, en donde el dominio de unión anti-CD19 está conectado al dominio transmembrana por una región bisagra, por ejemplo, en donde la región bisagra comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 45.

22. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 10 a 21, en donde la molécula de CAR comprende un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio coestimulador, en donde el dominio coestimulador comprende:

- (i) un dominio de señalización funcional de una proteína seleccionada entre: OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM -1, LFA-1 (CD11a/CD18) o 4-1BB (CD137); o
- (ii) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 51.

23. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 10 a 22, en donde la molécula de CAR comprende un dominio de señalización intracelular, en donde el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización funcional y/o un dominio de señalización primario, en donde:

- (i) el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización funcional de 4-1BB, un dominio de señalización funcional de CD3 zeta, o ambos; o
- (ii) el dominio de señalización intracelular comprende: un dominio de señalización primario que comprende una secuencia de CD27, un dominio de señalización funcional de CD3 zeta, o ambos.

24. El método de fabricación de la Reivindicación 23, en donde el dominio de señalización intracelular comprende:

- (i) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17, o ambas;
- (ii) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, la secuencia de SEQ ID NO: 43, o ambas;
- (iii) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 17, o ambas; o

(iv) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43, o ambas.

25. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 10 a 24, en el que la molécula de CAR comprende una secuencia líder.

26. El método de fabricación de la Reivindicación 25, en donde la secuencia líder comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.

27. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 10 a 26, en donde la molécula CAR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, o SEQ ID NO: 42.

28. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 10 a 27 en donde la mezcla de reacción o la composición comprende además, o el método comprende además poner en contacto con un agente que inhibe una molécula inmune inhibidora seleccionado entre: PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM, CEACAM-1, 3-CEACAM, CEACAM-5, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160 o 2B4.

29. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 28 que comprende $1-5 \times 10^8$ células que expresan CAR.

30. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 29, en donde la composición comprende además, o el método comprende además poner en contacto con una citoquina.

31. El método de fabricación de la Reivindicación 30, en donde la citoquina se selecciona entre IL-7, IL-15, IL-15Ra, IL-21, o una combinación de las mismas.

32. El método de fabricación de la Reivindicación 31, en donde la citoquina comprende IL-15 y IL-15Ra.

33. El método de fabricación de la Reivindicación 32, en donde la citoquina que comprende IL-15 e IL-15Ra es hetIL-15.

CAPÍTULO REIVINDICATORIO MODIFICADO

(Modificaciones Voluntarias)

1. Un método de fabricación de una célula efectora inmune o una población de células efectoras inmunes que expresan un CAR que se une a CD19 (una célula que expresa CAR19), que comprende:

poner en contacto la célula efectora inmune o población de células efectoras inmunes con un inhibidor de tirosina quinasa de Bruton (BTK) *in vitro*; en donde el inhibidor de BTK se selecciona de: ibrutinib, GDC-0834, RN-486, CGI-560, CGI-1764, HM-71224, CC-292, ONO-4059, CNX-774, o LFM-A13 e

introducir un ácido nucleico que codifica una molécula de CAR19 en la célula efectora inmune o población de células efectoras inmunes bajo condiciones tales que la molécula de CAR19 se expresa, en donde el paso de introducir comprende la transducción del ácido nucleico que codifica una molécula de CAR19 en la célula efectora inmune o población de células efectoras inmunes.

2. El método de fabricación de la Reivindicación 1, en el que la célula efectora inmune es una célula T o célula NK, o en el que la población de células efectoras inmunes incluye células T, células NK, o ambas.

3. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 2, que comprende poner en contacto la célula efectora inmune o población de células efectoras inmunes con el inhibidor de BTK por 10-20, 20-30, 30-40, 40-60, o 60-120 minutos y posteriormente eliminar la mayoría o todo el inhibidor de quinasa de la célula efectora inmune o población de células efectoras inmunes.

4. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3, en el que el inhibidor de quinasa se añade en cualquiera de los siguientes:

(i) después de que la célula efectora inmune o la población de células efectoras inmunes es cosechada;

(ii) antes de que la célula efectora inmune o la población de células efectoras inmunes es estimulada;

(iii) después de que la célula efectora inmune o la población de células efectoras inmunes es estimulada;

(iv) antes de que la célula efectora inmune o la población de células efectoras inmunes es transducida;

- (v) después de que la célula efectora inmune o la población de células efectoras inmunes es transducida; o
 - (vi) antes de la administración de las células a un sujeto.
5. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4, en el que el inhibidor de BTK es ibrutinib.
6. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5, que comprende además la depleción de células T reguladoras a partir de la población de células efectoras inmunes, en donde las células T reguladoras comprenden células CD25+.
7. Un método de fabricación de una célula efectora inmune o una población de células efectoras inmunes que expresan un CAR que se une a CD19 (una célula que expresa CAR19), que comprende:
- proporcionar una célula efectora inmune o una población de células efectoras inmunes que comprenden un ácido nucleico que codifica una molécula de CAR19 (una célula o población de células que expresa CAR19); y
 - poner en contacto la célula o población de células que expresa CAR19 con un inhibidor de tirosina quinasa de Bruton (BTK).
8. El método de fabricación de la Reivindicación 7, en donde el inhibidor BTK se selecciona entre ibrutinib, GDC-0834, RN-486, CGI-560, CGI-1764, HM-71224, CC-292, ONO-4059, CNX-774, o LFM-A13.
9. El método de fabricación de la Reivindicación 7 u 8, en donde poner en contacto la célula efectora inmune o la población de células efectoras inmunes con el inhibidor BTK ocurre *in vitro*.
10. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9, en donde la molécula de CAR19 comprende un dominio de unión anti-CD19, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular.
11. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9, en donde la molécula de CAR19 comprende un dominio de unión anti-CD19 comprende una cadena ligera de la región 1 determinante de complementariedad (LC CDR1), una cadena ligera de la región 2 determinante de complementariedad (LC CDR2), una cadena ligera de la región 3 determinante de complementariedad (LC CDR3), una cadena pesada de la región 1 determinante de complementariedad (HC CDR1), una cadena pesada de la región 2

determinante de complementariedad (HC CDR2), y una cadena pesada de la región 3 determinante de complementariedad (HC CDR3) de un dominio de unión anti-CD19.

12. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9, en donde el dominio de unión anti-CD19 comprende una cadena ligera de la región variable murina de la Tabla 7, una cadena pesada de la región variable murina de la Tabla 7, o ambas.

13. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9, en donde el dominio de unión anti-CD19 comprende la LC CDR1 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, la LC CDR2 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26, y la LC CDR3 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27.

14. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9, en donde el dominio de unión anti-CD19 comprende la HC CDR1 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19, la HC CDR2 de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 20-23, y la HC CDR3 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24.

15. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9, en donde el dominio de unión anti-CD19 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59.

16. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9, en donde el dominio de unión anti-CD19 es un dominio de unión anti-CD19 humanizado.

17. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9, en el que el dominio de unión a anti-CD19 humanizado comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre: la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12.

18. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9, en donde el dominio de unión anti-CD19 humanizado es un scFv que comprende una región variable de cadena ligera unida a una variable de cadena pesada a través de un enlazador, por ejemplo, en el que el enlazador comprende una secuencia de SEQ ID NO: 53.

19. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 10 a 18, en donde la molécula de CAR comprende un dominio transmembrana de una proteína seleccionada entre: la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, epsilon CD3, CD45, CD4,

CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 o CD154.

20. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 10 a 18, en donde el dominio transmembrana comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.

21. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 10 a 18, en donde el dominio de unión anti-CD19 está conectado al dominio transmembrana por una región bisagra, por ejemplo, en donde la región bisagra comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 45.

22. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 10 a 21, en donde la molécula de CAR comprende un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio coestimulador, en donde el dominio coestimulador comprende:

- (i) un dominio de señalización funcional de una proteína seleccionada entre: OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM -1, LFA-1 (CD11a/CD18) o 4-1BB (CD137); o
- (ii) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 51.

23. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 10 a 22, en donde la molécula de CAR comprende un dominio de señalización intracelular, en donde el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización funcional y/o un dominio de señalización primario, en donde:

- (i) el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización funcional de 4-1BB, un dominio de señalización funcional de CD3 zeta, o ambos; o
- (ii) el dominio de señalización intracelular comprende: un dominio de señalización primario que comprende una secuencia de CD27, un dominio de señalización funcional de CD3 zeta, o ambos.

24. El método de fabricación de la Reivindicación 23, en donde el dominio de señalización intracelular comprende:

- (i) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17, o ambas;
- (ii) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, la secuencia de SEQ ID NO: 43, o ambas;
- (iii) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 17, o ambas; o

(iv) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43, o ambas.

25. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 10 a 24, en el que la molécula de CAR comprende una secuencia líder.

26. El método de fabricación de la Reivindicación 25, en donde la secuencia líder comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.

27. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 10 a 26, en donde la molécula CAR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, o SEQ ID NO: 42.

28. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 10 a 27 en donde la mezcla de reacción o la composición comprende además, o el método comprende además poner en contacto con un agente que inhibe una molécula inmune inhibidora seleccionado entre: PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM, CEACAM-1, 3-CEACAM, CEACAM-5, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160 o 2B4.

29. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 28 que comprende $1-5 \times 10^8$ células que expresan CAR.

30. El método de fabricación de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 29, en donde la composición comprende además, o el método comprende además poner en contacto con una citoquina.

31. El método de fabricación de la Reivindicación 30, en donde la citoquina se selecciona entre IL-7, IL-15, IL-15Ra, IL-21, o una combinación de las mismas.

32. El método de fabricación de la Reivindicación 31, en donde la citoquina comprende IL-15 y IL-15Ra.

33. El método de fabricación de la Reivindicación 32, en donde la citoquina que comprende IL-15 e IL-15Ra es hetIL-15.