

**COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA PREPARAR LINFOCITOS DISEÑADOS POR
INGENIERÍA PARA TERAPIA CELULAR**

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad a la solicitud provisional de los EE. UU. núm. 63/346.709, presentada el 27 de mayo de 2022, de la solicitud provisional de los EE. UU. núm. 63/485.623, presentada el 17 de febrero de 2023, y de la solicitud provisional de los EE. UU. núm. 63/490.162, presentada el 14 de marzo de 2023, que se incorporan en la presente como referencia en su totalidad.

CAMPO TÉCNICO

La presente descripción se relaciona con el campo de la terapia celular y, más específicamente, a composiciones y métodos para elaborar linfocitos diseñados por ingeniería.

ANTECEDENTES

Las células inmunitarias se pueden modificar para atacar y destruir las células cancerosas en un paciente. Para aumentar la capacidad de las células inmunitarias para dirigirse y destruir una célula cancerosa particular, se han desarrollado métodos para diseñar por ingeniería las células inmunitarias para expresar constructos que dirigen las células inmunitarias a una célula cancerosa diana particular. Los receptores de antígenos quiméricos (CAR, por sus siglas en inglés) y los receptores de células T (TCR, por sus siglas en inglés) diseñados por ingeniería, que incluyen dominios de unión capaces de interactuar con un antígeno tumoral particular, permiten que las células inmunitarias se dirijan y destruyan células cancerosas que expresan el antígeno tumoral particular.

Un desafío importante surge con el proceso altamente complejo de ingeniería y producción de células autólogas, que típicamente demora al menos una semana y puede demorar hasta varias semanas. Durante el proceso, los linfocitos recolectados de los pacientes se

deben enviar al centro de procesamiento, mientras que las células producidas se deben criopreservar y después enviar de regreso al paciente para su implantación. Este proceso altamente complicado conduce necesariamente a costos elevados y aplicaciones clínicas limitadas.

Además, el largo proceso puede resultar en una reducción de la viabilidad celular y un aumento de la madurez de los linfocitos, ambos factores perjudiciales para la eficacia *in vivo*. Por lo tanto, existe una fuerte necesidad insatisfecha de desarrollar procesos que no solo sean de duración más corta, sino que generen células inmunitarias con eficacia terapéutica mejorada.

SUMARIO

Según lo previsto, el proceso actual de elaboración de células CAR autólogas típicamente tardan aproximadamente 7 días y puede ser mucho más largo. La presente descripción describe procesos mejorados que se pueden completar dentro de 6 o incluso 4 días (o dentro de 5 o incluso 3 días después de una etapa de enriquecimiento). En varios ejemplos, el proceso de 5 días (es decir, 5 días después del enriquecimiento) incluye etapas de preparación e implementación de transducción con un mayor número de linfocitos en contacto con vectores inmovilizados en fibronectina recombinante recubierta en la superficie interna de un sistema cerrado. Tal un procedimiento de transducción mejorado permite una etapa de expansión celular postransducción mucho más abreviada.

Sin embargo, un proceso mejorado aún más, que no requiere expansión postransducción en absoluto, se puede completar dentro de solo 3 días después de una etapa de enriquecimiento inicial. Se descubrió que, sorprendentemente, tanto el proceso de 3 días como el de 5 días producían linfocitos transducidos con mayores porcentajes de células juveniles. Al menos en parte debido al aumento de la población de células juveniles, estos

productos celulares mostraron una eficacia antitumoral *in vivo* muy mejorada en comparación con el proceso convencional de 7 días.

Por lo tanto, de acuerdo con una modalidad de la presente descripción, se proporciona un método para preparar linfocitos transducidos, que comprende incubar una muestra que
5 comprende linfocitos, obtenida de un sujeto donante, con un vector polinucleotídico para transducir los linfocitos para producir linfocitos transducidos; y cultivar la muestra que comprende los linfocitos transducidos durante menos de 72 horas antes de que se recolecten los linfocitos para producir una muestra recolectada.

En algunas modalidades, los linfocitos transducidos se cultivan durante menos de 48
10 horas antes de ser recolectados. En algunas modalidades, los linfocitos transducidos se cultivan durante menos de 36 horas antes de ser recolectados.

En algunas modalidades, la incubación se realiza en un sistema cerrado. En algunas modalidades, el sistema cerrado tiene un área de superficie interna de al menos 1500 cm². En algunas modalidades, el sistema cerrado tiene una superficie interna recubierta con una
15 fibronectina humana recombinante, en donde el recubrimiento se realiza con una solución que comprende aproximadamente 1-10 µg/ml de fibronectina humana recombinante. En algunas modalidades, la superficie interna está además en contacto con una segunda solución que comprende el vector polinucleotídico, en donde la segunda solución tiene un volumen de aproximadamente 200 ml. En algunas modalidades, el recubrimiento comprende además un
20 drenaje de la segunda solución. En algunas modalidades, la muestra en el sistema cerrado comprende al menos $1,5 \times 10^8$ linfocitos. En algunas modalidades, la muestra comprende al menos 4×10^8 linfocitos.

En algunas modalidades, los linfocitos son células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) o células T. En algunas modalidades, la muestra
25 recolectada comprende células CD3+. En algunas modalidades, la muestra recolectada comprende células T CD4+ y CD8+. En algunas modalidades, al menos 20 % de las células T CD4+ recolectadas son células T vírgenes, y no más de 12 % de las células T CD4+

recolectadas son células T de memoria efectora. En algunas modalidades, al menos 25 % de las células T CD4+ recolectadas son células T vírgenes, y no más de 9 % de las células T CD4+ recolectadas son células T de memoria efectora. En algunas modalidades, al menos 80 % de las células T CD4+ recolectadas son células CCR7+. En algunas modalidades, como máximo 20 % de las células T CD4+ recolectadas son una combinación de células T de memoria efectora y células T efectoras.

En algunas modalidades, al menos 10 % de las células T CD8+ recolectadas son células T vírgenes, y no más de 30 % de las células T CD8+ recolectadas son células T de memoria efectora. En algunas modalidades, al menos 20 % de las células T CD8+ recolectadas son células T vírgenes, y no más de 20 % de las células T CD8+ recolectadas son células T de memoria efectora. En algunas modalidades, las células T vírgenes se caracterizan como CCR7+ y CD45RA+. En algunas modalidades, las células T de memoria efectora se caracterizan como CCR7-, CD45RO+ y CD95+. En algunas modalidades, al menos 60 % de las células T CD8+ recolectadas son células CCR7+. En algunas modalidades, como máximo 40 % de las células T CD8+ recolectadas son una combinación de células T de memoria efectora y células T efectoras.

En algunas modalidades, el método comprende además adquirir los linfocitos del sujeto donante. En algunas modalidades, el método comprende además enriquecer los linfocitos. En algunas modalidades, el método comprende además poner en contacto la muestra con un agente estimulante de linfocitos para activar los linfocitos.

En algunas modalidades, la activación de la muestra es previa a incubar la muestra con el vector polinucleotídico. En algunas modalidades, la muestra comprende al menos 1×10^9 linfocitos. En algunas modalidades, la activación de la muestra es después de que la muestra se incuba con el vector polinucleotídico. En algunas modalidades, el agente estimulante de linfocitos comprende un anticuerpo anti-CD3 y/o un anticuerpo anti-CD28.

En algunas modalidades, el método comprende además, después de la recolección, administrar los linfocitos recolectados a un sujeto o congelar los linfocitos recolectados. En

algunas modalidades, el sujeto es el mismo que el sujeto donante. En algunas modalidades, se administra al sujeto un total de 10.000 a 3.000.000 de linfocitos recolectados por kilogramo del sujeto. En algunas modalidades, se administra al sujeto un total de 20.000 a 400.000 linfocitos recolectados por kilogramo del sujeto. En algunas modalidades, al menos 15 % de los linfocitos recolectados se transducen con el vector.

En algunas modalidades, el vector polinucleotídico es un vector viral. En algunas modalidades, el vector viral es un vector retroviral o un vector lentiviral. En algunas modalidades, el vector codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) o un receptor de células T (TCR). En algunas modalidades, el CAR comprende un dominio coestimulador

intracelular. En algunas modalidades, el dominio coestimulador intracelular es una región de señalización de una proteína seleccionada del grupo que consiste en DAP-10, CD28, OX-40, 4-1BB (CD137), CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, muerte programada-1 (PD-1), coestimulador de células T inducible (ICOS, por sus siglas en inglés), antígeno 1 asociado a la función de los linfocitos (LFA-1, CD11a/CD18), CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD247, CD276 (B7-H3), miembro 14 de la superfamilia del factor de necrosis tumoral, TNFSF14, LIGHT), NKG2C, Ig alfa (CD79a), receptor Fc gamma, molécula MHC clase I, proteínas receptoras de TNF, proteínas similares a inmunoglobulinas, receptores de citocinas, integrinas, moléculas de activación linfocítica de señalización (proteínas SLAM), activación de receptores de células NK, BTLA, un receptor de ligando Toll, CDS, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8 alfa, CD8 beta, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD (CD11d), ITGAE (CD103), ITGAL (CD11a), ITGAM (CD11b), ITGAX (CD11c), ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE (RANKL), DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (táctil), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG (Cbp), CD19a, un ligando que se une

específicamente a CD83 y combinaciones de estos. En algunas modalidades, el dominio coestimulador intracelular es una región de señalización de CD28.

En algunas modalidades, el CAR o TCR reconoce un antígeno tumoral. En algunas modalidades, el antígeno tumoral es CD19. En algunas modalidades, el linfocito que comprende el CAR es axicabtagén ciloleucel o brexucabtagén autoleucel. En algunas modalidades, el antígeno tumoral es CD19 y/o CD20. En algunas modalidades, el anticuerpo tumoral es CLL-1.

En algunas modalidades, el CAR o TCR reconoce un antígeno que comprende 2B4 (CD244), 4-1BB, 5T4, antígeno A33, antígeno de adenocarcinoma, adrenoceptor beta 3 (ADRB3, por sus siglas en inglés), proteína de anclaje a quinasa 4 (AKAP-4, por sus siglas en inglés), alfa-fetoproteína (AFP, por sus siglas en inglés), quinasa de linfoma anaplásico (ALK, por sus siglas en inglés), receptor andrógeno, B7H3 (CD276), integrinas β 2, BAFF, célula de linfoma B, antígeno de maduración de células B (BCMA, por sus siglas en inglés), bcr-abl (proteína de fusión de oncogén que consiste en la región de agrupación del punto de ruptura (BCR, por sus siglas en inglés) y homólogo 1 del oncogén viral de leucemia murina de Abelson (Abl, por sus siglas en inglés), BhCG, antígeno de células estromales de médula ósea 2 (BST2, por sus siglas en inglés), (BORIS o hermano del regulador de sitios impresos) similar a factor de unión a CCCTC (proteína con dedos de zinc), BST2, antígeno C242, marcador 9-0-acetil-CA19-9, CA-125, CAEX, calreticulina, anhidrasa carbónica 9 (CAIX, por sus siglas en inglés), C-MET, CCR4, CCR5, CCR8, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD7, CD10, CD16, CD19, CD20, CD22, CD23 (receptor de IgE), CD24, CD25, CD27, CD28, CD30 (TNFRSF8), CD33, CD34, CD38, CD40, CD40L, CD41, CD44, CD44V6, CD49f, CD51, CD52, CD56, CD63, CD70, CD72, CD74, CD79a, CD79b, CD80, CD84, CD96, CD97, CD100, CD123, CD125, CD133, CD137, CD138, CD150, CD152 (CTLA-4), CD160, CD171, CD179a, CD200, CD221, CD229, CD244, CD272 (BTLA), CD274 (PDL-1, B7H1), CD279 (PD-1), CD352, CD358, miembro f de la familia similar a la molécula CD300 (CD300LF, por sus siglas en inglés), antígeno carcinoembrionario (CEA, por sus siglas en inglés), claudina 6 (CLDN6), molécula

1 similar a lectina tipo C (CLL-1 o CLECL1, por sus siglas en inglés), miembro A de la familia
 12 de dominio de lectina tipo C (CLEC12A), un antígeno de célula infectado por
 citomegalovirus (CMV, por sus siglas en inglés), CNT0888, CRTAM (CD355), CS-1 (también
 denominado como subconjunto 1 de CD2, CRACC, CD319 y 19A24), CTLA-4, ciclina B1,
 5 marco de lectura abierto 61 de cromosoma X (CXORF61, por sus siglas en inglés), citocromo
 P450 1B 1 (CYP1B1), DNAM-1 (CD226), desmogleína 4, DR3, DR5, neoepítipo de E-
 cadherina, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés),
 EGF1R, variante III de receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFRvIII, por sus siglas
 en inglés), glicoproteína-2 epitelial (EGP-2, por sus siglas en inglés), glicoproteína 40 epitelial
 10 (EGP-40, por sus siglas en inglés), módulo similar al EGF que contiene el receptor de la
 hormona similar a la mucina tipo 2 (EMR2, por sus siglas en inglés), factor de elongación 2
 mutado (ELF2M), endosialina, molécula de adhesión celular epitelial (EPCAM, por sus siglas
 en inglés), receptor 2 de efrina tipo A (EphA2, por sus siglas en inglés), efrina B2, receptor
 de proteína tirosina quinasa, erb-B2,3,4 (erb-B2,3,4), ERBB, ERBB2 (Her2/neu), ERG (gen
 15 de fusión de ETS de proteasa transmembrana, serina 2 (TMPRSS2), ETA, gen 6 de variante
 de translocación de ETS, ubicado en el cromosoma 12p (ETV6-AML), fragmento Fc del
 receptor de IgA (FCAR o CD89, por sus siglas en inglés), proteína alfa de activación de
 fibroblastos (FAP, por sus siglas en inglés), FBP, receptor Fc tipo 5 (FCRL5, por sus siglas
 en inglés), receptor de acetilcolina fetal (AChR, por sus siglas en inglés), domino B extra de
 20 fibronectina, tirosina quinasa 3 similar a fms (FLT3, por sus siglas en inglés), proteína de
 unión al folato (FBP, por sus siglas en inglés), receptor de folato 1, receptor de folato α ,
 receptor de folato β , antígeno 1 relacionado con Fos, fucosilo, fucosilo GM1; GM2,
 gangliósido G2 (GD2), gangliósido GD3 (aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)bDGalp(I-4)bDGlc(I-
 I)Cer), gangliósido o-acetil-GD2 (OAcGD2), GTR (TNFRSF 18), GM1, gangliósido GM3
 25 (aNeu5Ac(2-3)bDGalp(I-4)bDGlc(I-I)Cer), GP 100, porción hexasacárida de la
 glicoceramida globoH (GloboH), glicoproteína 75, Glypican-3 (GPC3), glicoproteína 100
 (gplOO), GPNMB, receptor 20 acoplado a proteína G (GPR20), receptor acoplado a proteína

G clase C grupo 5, miembro D (GPC5D), receptor celular 1 del virus de la hepatitis A (HAVCR1), receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2), HER2/neu, HER3, HER4, HGF, antígeno asociado al melanoma de alto peso molecular (HMWMAA), virus del papiloma humano E6 (VPH E6), virus del papiloma humano E7 (VPH E7), proteína de choque térmico 70-2 mutada (mut hsp70-2), receptor cinasa del factor de dispersión humano, transcriptasa inversa de la telomerasa humana (hTERT), HVEM, ICOS, receptor 1 del factor de crecimiento similar a la insulina (receptor IGF-1), IGF-I, IgG1, polipéptido 1 similar a la inmunoglobulina lambda (IGLL1), IL-6, receptor alfa de la interleucina 11 (IL-11Ra), IL-13, subunidad alfa-2 del receptor de la interleucina 13 (IL-13Ra2 o CD213A2), receptor del factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF1-R), integrina $\alpha 5\beta 1$, integrina $\alpha v\beta 3$, carboxilesterasa intestinal, cadena κ -luz, KCS1, receptor del dominio de inserción de la quinasa (KDR), KIR, KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR3DL2, KIR-L, ligandos KG2D, KIT (CD117), KLRG1, LAGE-Ia, LAG3, proteína tirosina cinasa específica de linfocitos (LCK), receptor similar a la inmunoglobulina leucocitaria subfamilia A miembro 2 (LILRA2), legumina, receptor similar a la inmunoglobulina asociada a leucocitos 1 (LAIR1), antígeno Lewis(Y), LeY, LG, molécula de adhesión celular LI (LI-CAM), LIGHT, LMP2, complejo antígeno linfocitario 6, LTBR, locus K 9 (LY6K), Ly-6, antígeno linfocitario 75 (LY75), antígeno testicular del cáncer de melanoma- 1 (MAD-CT-1); antígeno de melanoma cáncer de testículo 2 (MAD-CT-2), MAGE, antígeno asociado al melanoma 1 (MAGE-A1), antígeno de melanoma MAGE-A3 reconocido por células T 1 (MelanA o MARTI), MelanA/MARTI, mesotelina, MAGE A3, inhibidor de apoptosis de melanoma (ML-IAP), proteoglicano sulfato de condroitina específico del melanoma (MCSCP), MORAb-009, MS4A1, mucina 1 (MUC1), MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC, MUC5b, MUC7, MUC16, CanAg de mucina, receptor tipo II de sustancia inhibidora mulleriana (MIS, por sus siglas en inglés), homólogo derivado de neuroblastoma del oncogén de mielocitomatosis aviar viral v-myc (MYCN), ácido N-glicolilneurámico, N-acetilglucosaminil-transferasa V (NA17), molécula de adhesión celular neural (NCAM, por sus siglas en inglés), NKG2A, NKG2C, NKG2D, ligandos NKG2E, NKR-P 1A, NPC-1C, NTB-

A, antígeno de diferenciación de la glándula mamaria (NY-BR-1), NY-ESO-1, antígeno oncofetal (h5T4), receptor olfatorio 51E2 (OR51E2), OX40, antígeno de células plasmáticas, poli SA, proteína de unión a la proacrosina sp32 (OY-TES I), p53, p53 mutante, panexina 3 (PANX3), fosfatasa de ácido prostático (PAP, por sus siglas en inglés), proteína de caja

5 pareada Pax-3 (PAX3), proteína de caja pareada Pax-5 (PAX5), antígeno tumoral de carcinoma de próstata 1 (PCTA-1 o galectina 8), PD-1H, receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas alfa (PDGFR-alfa), PDGFR-beta, PDL192, PEN-5, fosfatidilserina, placenta específica 1 (PLAC1), ácido polisiálico, prostasa, células de carcinoma de próstata, prosteína, proteasa serina 21 (testisin o PRSS21), proteinasa 3 (PR1), antígeno de células

10 madre de próstata (PSCA, por sus siglas en inglés), antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), subunidad del proteasoma (prosoma, macropain), tipo beta, receptor para productos finales de glicación avanzada (RAGE-1), RANKL, Ras mutante, miembro C de la familia de homólogos de Ras (RhoC), RON, receptor 1 huérfano similar al receptor tirosina quinasa (ROR1), ubicuo renal 1 (RU1), ubicuo renal 2 (RU2), puntos de ruptura de la

15 translocación del sarcoma, antígeno de carcinoma de células escamosas reconocido por células T 3 (SART3), SAS, SDC1, SLAMF7, molécula de adhesión de sialil Lewis (sLe), Siglec-3, Siglec-7, Siglec-9, molécula de señalización Sonic Hedgehog (SHH), proteína de esperma 17 (SPA17), antígeno embrionario 4 específico de etapa (SSEA-4), STEAP, antígeno sTn, sarcoma sinovial, punto de ruptura X 2 (SSX2), survivina, glicoproteína

20 asociada al tumor 72 (TAG72), TCR5y, TCRa, TCRB, proteína de marco de lectura alternativo del TCR gamma (TARP, por sus siglas en inglés), telomerasa, precursor de TNF- α TIGIT, marcador endotelial tumoral 1 (TEM1/CD248), marcador endotelial tumoral 7-relacionado (TEM7R, por sus siglas en inglés), tenascina C, TGF beta 2, TGF- β , transglutaminasa 5 (TGS5), receptor de superficie celular de unión a la angiopoyetina 2 (tie

25 2), TIM1, TIM2, TIM3, Tn Ag, TRAIL-R1, TRAIL-R2, proteína relacionada con tirosinasa 2 (TRP-2), receptor de la hormona estimuladora de la tiroides (TSHR, por sus siglas en inglés), antígeno tumoral CTAA16.88, tirosinasa, ROR1, TAG- 72, uroplaquina 2 (UPK2), VEGF-A,

VEGFR-1, receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2), y vimentina, proteína del tumor de Wilms (WT1), o familia de antígeno X, miembro 1A (XAGE1), o combinaciones de estos.

También se proporciona, en una modalidad, una población de células preparadas a partir de una muestra de sangre de un sujeto donante, que comprende células T CD4+ y células T CD8+, en donde: al menos 20 % de las células T CD4+ recolectadas son células T vírgenes, y no más de 12 % de las células T CD4+ recolectadas son células T de memoria efectora; al menos 10 % de las células T CD8+ recolectadas son células T vírgenes, y no más de 30 % de las células T CD8+ recolectadas son células T de memoria efectora; al menos 50 % de las células recolectadas son células T CD3+; y al menos 25 % de todas las células T se transducen con un vector polinucleotídico que codifica un CAR o TCR.

También se proporciona, en una modalidad, una población de células preparadas a partir de una muestra de sangre de un sujeto donante, que comprende células T CD4+ y células T CD8+, en donde: al menos 80 % de las células T CD4+ son células CCR7+; al menos 60 % de las células T CD8+ son células CCR7+; como máximo 20 % de las células T CD4+ son una combinación de células T de memoria efectora y células T efectoras; y como máximo 40 % de las células T CD8+ son una combinación de células T de memoria efectora y las células T efectoras se transducen con un vector polinucleotídico que codifica un CAR o TCR.

En algunas modalidades, al menos 25 % de las células T CD4+ recolectadas son células T vírgenes, y no más de 9 % de las células T CD4+ recolectadas son células T de memoria efectora. En algunas modalidades, al menos 20 % de las células T CD8+ recolectadas son células T vírgenes, y no más de 20 % de las células T CD8+ recolectadas son células T de memoria efectora. En algunas modalidades, las células T vírgenes se caracterizan como CCR7+ y CD45RA+. En algunas modalidades, las células T de memoria efectora se caracterizan como CCR7-, CD45RO+ y CD95+. En algunas modalidades, al menos 65 %

de las células recolectadas son células T CD3+. En algunas modalidades, al menos 15 % de todas las células T se transducen con el vector polinucleotídico.

En algunas modalidades, al menos 80 % de las células T CD4+ recolectadas son células CCR7+. En algunas modalidades, como máximo 20 % de las células T CD4+ recolectadas son una combinación de células T de memoria efectora y células T efectoras. En algunas modalidades, al menos 60 % de las células T CD8+ recolectadas son células CCR7+. En algunas modalidades, como máximo 40 % de las células T CD8+ recolectadas son una combinación de células T de memoria efectora y células T efectoras.

En algunas modalidades, el vector polinucleotídico es un vector viral. En algunas modalidades, el vector viral es un vector retroviral o un vector lentiviral. En algunas modalidades, el CAR comprende un dominio coestimulador intracelular. En algunas modalidades, el dominio coestimulador intracelular es una región de señalización de CD28. En algunas modalidades, el CAR reconoce un antígeno tumoral. En algunas modalidades, el antígeno tumoral es CD19. En algunas modalidades, la población de células que comprenden el CAR son axicabtagén ciloleucel o brexucabtagén autoleucel.

También se proporciona una composición farmacéutica que comprende la población de células como se describe en la presente.

Aun otra modalidad proporciona un método para administrar células T a un sujeto, que comprende inyectar al sujeto una muestra recolectada preparada mediante el método de la presente descripción, o la composición farmacéutica. En algunas modalidades, el sujeto tiene cáncer. En algunas modalidades, el cáncer es una neoplasia maligna de células B. En algunas modalidades, el cáncer es linfomas no Hodgkin (NHL, por sus siglas en inglés), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL, por sus siglas en inglés), linfoma linfocítico pequeño (SLL/CLL, por sus siglas en inglés), linfoma de células del manto (MCL, por sus siglas en inglés), linfoma folicular (FL, por sus siglas en inglés), linfoma de zona marginal (MZL, por sus siglas en inglés), extranodal (linfoma MALT), nodal (linfoma

monocitoide de células B), esplénico, linfoma difuso de células grandes, leucemia/linfoma linfocítico crónico de células B, linfoma de Burkitt, linfoma linfoblástico, leucemia mieloide aguda o mieloma múltiple.

5

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

Para que la presente descripción se entienda más fácilmente, se definen primero ciertos términos más abajo. Las definiciones adicionales para los siguientes términos y otros términos se establecen a lo largo de la especificación.

10 A menos que se indique o sea obvio específicamente por contexto, como se usa en la presente descripción, el término “o” se entiende que es inclusivo y cubre tanto “o” como “y”.

El término “y/o” donde se usa en la presente descripción va a tomarse como una descripción específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin los
15 otros. Por lo tanto, el término “y/o” como se usa en una frase tal como “A y/o B” en la presente descripción pretende incluir A y B; A o B; A (solo); y B (sola). De la misma manera, el término “y/o” como se usa en una frase tal como “A, B y/o C” pretende abarcar cada uno de los siguientes aspectos: A, B y C; A, B o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo).

20 A menos que se indique o sea evidente específicamente por contexto, el término “aproximadamente” se refiere a un valor o composición que está dentro de un rango de error aceptable para el valor o composición particular como lo determina un experto en la técnica, que dependerá en parte de cómo se mide o determina el valor o la composición, es decir, las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, “aproximadamente” o “que está
25 compuesto/a esencialmente de” puede significar dentro de una o más de una desviación estándar según la práctica en la técnica. “Aproximadamente” o “que está compuesto/a esencialmente de” puede significar un rango de hasta 10 % (es decir, $\pm 10\%$). Por lo tanto,

“aproximadamente” puede entenderse que está dentro de 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,01 % o 0,001 % mayor o menor que el valor indicado. Por ejemplo, aproximadamente 5 mg pueden incluir cualquier cantidad entre 4,5 mg y 5,5 mg. Además, particularmente con respecto a los sistemas o procesos biológicos, los términos

5 pueden significar hasta un orden de magnitud o hasta 5 veces un valor. Cuando se proporcionan valores o composiciones particulares en la presente descripción, a menos que se indique de cualquier otra manera, deberá asumirse que el significado de “aproximadamente” o “que están compuestos/as esencialmente de” está dentro de un rango de error aceptable para ese valor o composición particular.

10 “Administrar” se refiere a la introducción física de un agente a un sujeto, tal como una célula T modificada descrita en la presente, usando cualquiera de los diversos métodos y sistemas de suministro conocidos por los expertos en la técnica. Las vías de administración ilustrativas para las formulaciones descritas en la presente incluyen vías de administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, espinal u otras vías parenterales, por ejemplo,

15 mediante inyección o infusión. La frase “administración parenteral” significa modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, usualmente por inyección e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intralinfática, intralesional, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular,

20 subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal, así como electroporación *in vivo*. En algunas modalidades, la formulación se administra a través de una vía no parenteral, *p. ej.*, por vía oral. Otras vías no parenterales incluyen una vía de administración tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo, por vía intranasal, vaginal, rectal, sublingual o tópica. La administración también puede realizarse, por ejemplo, una vez, una pluralidad de veces y/o durante uno o

25 más períodos prolongados.

El término “alogénico” se refiere a cualquier material derivado de un individuo que, después, se introduce en otro individuo de la misma especie, *p. ej.*, trasplante alogénico de células T.

El término “anticuerpo” (Ab) incluye, sin limitación, una inmunoglobulina de glicoproteína que se une específicamente a un antígeno. En general, y el anticuerpo puede comprender al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una molécula de unión al antígeno de estas. Cada cadena H comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente descripción como VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios constantes, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente descripción como VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio constante: CL. Las regiones de VH y VL pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR, por sus siglas en inglés). Cada VH y VL comprende tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino terminal hasta el extremo carboxi terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, y FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los Abs pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores huésped, que incluyen varias células del sistema inmunitario (*p. ej.*, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico. En general, los anticuerpos humanos son aproximadamente 150 kD de agentes tetraméricos compuestos de dos polipéptidos de cadena pesada (H) idénticos (aproximadamente 50 kD cada uno) y dos polipéptidos de cadena ligera (L) idénticos (aproximadamente 25 kD cada uno) que se asocian entre sí en lo que comúnmente se denomina una estructura “en forma de Y”. Las cadenas pesada y ligera se unen o conectan entre sí mediante un enlace disulfuro simple; dos otros enlaces disulfuro conectan las regiones

de bisagra de cadena pesada entre sí, de manera que los dímeros se conectan entre sí y se forma el tetrámero. Los anticuerpos producidos naturalmente también se glicosilan, *p. ej.*, en el dominio CH2.

Una “molécula de unión al antígeno”, “porción de unión al antígeno”, “fragmento de unión al antígeno” o “fragmento de anticuerpo” se refiere a cualquier molécula que comprende las partes de unión al antígeno (*p. ej.*, CDR) del anticuerpo del cual se deriva la molécula.

Una molécula de unión al antígeno puede incluir las regiones determinantes de complementariedad (CDR) antigénicas. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, dAb, anticuerpos lineales,

anticuerpos scFv y anticuerpos multiespecíficos formados de las moléculas de unión al antígeno. Los peptidocuerpos (es decir, moléculas de fusión de Fc que comprenden dominios de unión al péptido) son otro ejemplo de moléculas de unión al antígeno adecuadas. En algunas modalidades, la molécula de unión al antígeno se une a un antígeno en una célula tumoral. En algunas modalidades, la molécula de unión al antígeno se une a un antígeno en una célula involucrada en una enfermedad hiperproliferativa o a un antígeno viral o bacteriano. En ciertas modalidades una molécula de unión al antígeno es un receptor de antígeno quimérico (CAR) o un receptor de células T diseñadas genéticamente (TCR).

El término “región variable” o “dominio variable” se usa indistintamente. La región variable se refiere, típicamente, a una porción de un anticuerpo, generalmente, una porción de una cadena ligera o pesada, típicamente aproximadamente los 110 a 120 aminoácidos de amino-terminal en la cadena pesada madura y aproximadamente 90 a 115 aminoácidos en la cadena ligera madura, que difieren ampliamente en secuencia entre los anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de un anticuerpo particular para su antígeno particular. La variabilidad en secuencia se concentra en aquellas regiones llamadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), mientras las regiones más altamente conservadas en el dominio variable se llaman regiones marco (FR). Sin intención de limitarse a cualquier mecanismo o teoría particular, se cree que las CDR de las cadenas ligera y

pesada son principalmente responsables de la interacción y especificidad del anticuerpo con antígeno. En ciertas modalidades, la región variable es una región variable humana. En ciertas modalidades, la región variable comprende CDR de roedor o murino y regiones marco (FR) humanas. En modalidades particulares, la región variable es una región variable de primate (p. ej., primate no humano). En ciertas modalidades, la región variable comprende CDR de roedor o murino y regiones marco (FR) de primate (p. ej., primate no humano).

Los términos “VL” y “dominio VL” se usan indistintamente para referirse a la región variable de cadena ligera de un anticuerpo o una molécula de unión al antígeno de este.

Los términos “VH” y “dominio VH” se usan indistintamente para referirse a la región variable de cadena pesada de un anticuerpo o una molécula de unión al antígeno de este.

Comúnmente, están en uso un número de definiciones de las CDR: numeración de Kabat, numeración Chothia, numeración de AbM o numeración de contacto (Contact, en inglés). La definición de AbM es un compromiso entre los dos usados por el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. La definición de contacto se basa en un análisis de las estructuras de cristal complejas disponibles.

El término “autólogo” se refiere a cualquier material derivado del mismo individuo al que se reintroduce posteriormente. Por ejemplo, el método de terapia de células autólogas diseñadas genéticamente (eACT™, por sus siglas en inglés) descrito en la presente involucra la recolección de linfocitos de un paciente, que se diseñan genéticamente, después, para expresar, p. ej., un constructo de CAR y se administran de regreso, después, al mismo paciente.

“Receptor de antígeno quimérico” o “CAR” se refiere a una molécula diseñada genéticamente para comprender un motivo de unión y un medio de activación de células inmunitarias (por ejemplo, células T tales como células T indiferenciadas, células T de memoria central, células T de memoria efectoras o una combinación de estas) después de la unión al antígeno. Los CAR también se conocen como receptores de células T artificiales, receptores de células T quiméricos o inmunorreceptores quiméricos. En algunas modalidades, un CAR comprende un

motivo de unión, un dominio extracelular, un dominio transmembrana, uno o más dominios coestimuladores y un dominio de señalización intracelular. Una célula T que se ha diseñado genéticamente para expresar un receptor de antígeno quimérico puede denominarse una célula CAR T. “Dominio extracelular” (o “ECD”) se refiere a una porción de un polipéptido que, cuando el polipéptido está presente en una membrana celular, se entiende que reside fuera de la membrana celular, en el espacio extracelular.

Un “receptor de células T” o “TCR” se refiere a las moléculas de reconocimiento de antígeno presentes en la superficie de células T. Durante el desarrollo normal de células T, cada uno de los cuatro genes de TCR, α , β , γ y δ , puede reorganizarse lo que conduce a proteínas TCR altamente diversas.

El término “heterólogo” significa de cualquier fuente distinta de las secuencias de origen natural. Por ejemplo, una secuencia heteróloga incluida como una parte de una proteína coestimuladora es de aminoácidos que no son de origen natural como, es decir, no se alinean con, la proteína coestimuladora humana silvestre. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos heteróloga se refiere a una secuencia de nucleótidos distinta a la de la secuencia de codificación de la proteína coestimuladora humana silvestre.

El término “identidad” se refiere al parentesco general entre moléculas poliméricas, *p. ej.*, entre moléculas de ácido nucleico (*p. ej.*, moléculas de ADN y/o moléculas de ARN) y/o entre moléculas de polipéptidos. Se conocen métodos para el cálculo de un porcentaje de identidad entre dos secuencias de polipéptidos proporcionadas. El cálculo del porcentaje de identidad de dos secuencias de ácido nucleico o polipéptido, por ejemplo, puede realizarse al alinear las dos secuencias para propósitos de comparación óptimos (*p. ej.*, pueden introducirse espacios en una o ambas de una primera y una segunda secuencias para una alineación óptima y pueden ignorarse secuencias no idénticas para propósitos de comparación). Después, se comparan los nucleótidos o aminoácidos en las posiciones correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia es ocupada por el mismo residuo (*p. ej.*, nucleótido o aminoácido) como la posición correspondiente en la segunda secuencia, después, las

moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, que consideran, opcionalmente, el número de espacios, y la longitud de cada espacio, que puede necesitar introducirse para una alineación óptima de las dos secuencias. La comparación o
5 alineación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias pueden lograrse usando un algoritmo matemático, tal como BLAST (herramienta básica de búsqueda de alineación local). En algunas modalidades, las moléculas poliméricas se consideran “homólogas” entre sí si sus secuencias son al menos 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % idénticas (*p. ej.*,
10 85–90 %, 85–95 %, 85–100 %, 90–95 %, 90–100 % o 95–100 %).

Las células inmunitarias de la inmunoterapia pueden provenir de cualquier fuente conocida en la técnica. Por ejemplo, las células inmunitarias se pueden diferenciar *in vitro* de una población de células madre hematopoyéticas, o las células inmunitarias se pueden obtener de un sujeto. Las células inmunitarias se pueden obtener de, *p. ej.*, células mononucleares
15 de sangre periférica (PBMC), médula ósea, tejido de los ganglios linfáticos, sangre del cordón umbilical, tejido del timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, efusión pleural, tejido del bazo y tumores. Además, las células inmunitarias se pueden derivar de una o más líneas de células inmunitarias disponibles en la técnica. Las células inmunitarias también se pueden obtener de una unidad de sangre recolectada de un sujeto usando cualquier
20 número de técnicas conocidas por el experto, tales como la separación por FICOLL™, la separación por OPTIPREP™ y/o aféresis. Los métodos adicionales para aislar células inmunitarias para una terapia de células inmunitarias se describen en la publicación de la patente de los EE. UU. núm. 2013/0287748, que se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad.

25 Un “paciente” incluye cualquier ser humano aquejado por un cáncer (*p. ej.*, un linfoma o una leucemia). Los términos “sujeto” y “paciente” se usan indistintamente en la presente descripción.

El término “farmacéuticamente aceptable” se refiere a una molécula o composición que, cuando se administra a un receptor, no es perjudicial para el receptor de esta, o que cualquier efecto perjudicial se supera mediante un beneficio al receptor de este. Con respecto a un portador, diluyente o excipiente usado para formular una composición como

5 se describe en la presente, un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable debe ser compatible con los otros ingredientes de la composición y no perjudiciales para el receptor de este, o cualquier efecto perjudicial debe superarse mediante un beneficio al receptor. El término “portador farmacéuticamente aceptable” significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un

10 agente de relleno, diluyente, excipiente o material encapsulante de solvente líquido o sólido, involucrado en portar o transportar un agente de una porción del cuerpo a otro (*p. ej.*, de un órgano a otro). Cada portador presente en una composición farmacéutica debe ser “aceptable” en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no perjudicial para el paciente, o cualquier efecto perjudicial debe

15 superarse mediante un beneficio al receptor. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables comprenden: azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de papa; celulosa, y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes, tales como

20 manteca de cacao y ceras para supositorios; aceites, tales como aceite de maní, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de poroto de soja glicoles, tales como propilenglicol; polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes reguladores, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de

25 aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; soluciones reguladas con pH; poliésteres, policarbonatos y/o

polianhídridos; y otras sustancias compatibles no tóxicas usadas en formulaciones farmacéuticas.

El término “composición farmacéutica” se refiere a una composición en la que un agente activo se formula junto con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. En

5 algunas modalidades, el agente activo está presente en una cantidad de dosis unitaria adecuada para la administración en un régimen terapéutico que muestra una probabilidad estadísticamente significativa para lograr un efecto terapéutico predeterminado cuando se administra a un sujeto o población relevante. En algunas modalidades, una composición farmacéutica puede formularse para la administración en forma sólida o

10 líquida, que comprende, sin limitación, una forma adaptada para lo siguiente: administración oral, por ejemplo, soluciones (soluciones o suspensiones acuosas o no acuosas), tabletas, *p. ej.*, los dirigidos para absorción bucal, sublingual, y sistémica, bolos, polvos, gránulos, pastas para aplicación a la lengua; administración parenteral, por ejemplo, por inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o epidural como, por

15 ejemplo, una solución o suspensión estéril, o formulación de liberación sostenida; aplicación tópica, por ejemplo, como una crema, ungüento, o un rociador o parche de liberación controlada aplicado a la piel, pulmones o cavidad bucal; vía intravaginal o intrarrectal, por ejemplo, como un pesario, crema, o espuma; vía sublingual, vía ocular; vía transdérmica; vía nasal, pulmonar y a otras superficies mucosas.

20 Los términos “que reduce” y “que disminuye” se usan indistintamente en la presente descripción e indican cualquier cambio que sea menor que el original. “Reducir” y “disminuir” son términos relativos que requieren una comparación entre mediciones previas y posteriores. “Reducción” y “disminución” incluyen la reducción completa.

El término “referencia” describe una norma o control en relación con la/el cual se realiza

25 una comparación. Por ejemplo, en algunas modalidades, un agente, animal, individuo, población, muestra, secuencia, o valor de interés se compara con una referencia o control que es un agente, animal, individuo, población, muestra, secuencia o valor. En algunas

modalidades, se evalúa, se mide y/o se determina sustancialmente simultáneamente una referencia o control con la prueba, medición o determinación de interés. En algunas modalidades, una referencia o control es una referencia o control histórico, opcionalmente incorporado en un medio tangible. Generalmente, se determina o se caracteriza una referencia o control bajo condiciones o circunstancias comparables a las que están bajo evaluación. Cuando están presentes suficientes similitudes para justificar la dependencia de y/o comparación con una referencia o control seleccionado.

Una “cantidad terapéuticamente efectiva”, “dosis efectiva”, “cantidad efectiva” o “dosis terapéuticamente efectiva” de un agente terapéutico, *p. ej.*, células T con CAR diseñadas genéticamente, es cualquier cantidad que, cuando se usa sola o en combinación con otro agente terapéutico, protege a un sujeto contra el inicio de una enfermedad o promueve la regresión de la enfermedad evidenciada por una disminución en la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de los períodos libres de síntomas de la enfermedad, o una prevención de deterioro o discapacidad debido a la afección de la enfermedad. La capacidad de un agente terapéutico para promover la regresión de la enfermedad puede evaluarse usando una variedad de métodos conocidos por los profesionales, tales como en sujetos humanos durante ensayos clínicos, en sistemas de modelo animal que predicen la eficacia en humanos, o al analizar la actividad del agente en ensayos *in vitro*.

Los términos “transducción” y “transducido” se refieren al proceso por el cual el ácido nucleico extraño se introduce en una célula a través del vector viral (*ver*, Jones et al., “Genetics: principles and analysis,” Boston: Jones & Bartlett Publ. (1998)). En algunas modalidades, el vector es un vector retroviral, un vector de ADN, un vector de ARN, un vector adenoviral, un vector baculoviral, un vector viral de Epstein Barr, un vector de papiloma virus, un vector viral vaccinia, un vector viral de herpes simple, un vector asociado a adenovirus, un vector lentiviral o cualquier combinación de estos.

“Tratamiento” o “tratar” un sujeto se refiere a cualquier tipo de intervención o proceso realizado sobre, o la administración de un agente activo a, el sujeto con el objetivo de invertir, aliviar, mejorar, inhibir, ralentizar o prevenir el inicio, progresión, desarrollo, gravedad o recurrencia de un síntoma, complicación o afección, o marcas distintivas bioquímicas asociadas con una enfermedad. En una modalidad, “tratamiento” o “tratar” incluye una remisión parcial. En otra modalidad, “tratamiento” o “tratar” incluye una remisión completa. En algunas modalidades, el tratamiento puede ser de un sujeto que no presenta signos de la enfermedad, trastorno y/o afección relevante y/o de un sujeto que exhibe presenta solo signos tempranos de la enfermedad, trastorno y/o afección. En algunas modalidades, tal tratamiento puede ser de un sujeto que presenta uno o más signos establecidos de la enfermedad, trastorno y/o afección relevante. En algunas modalidades, el tratamiento puede ser de un sujeto que se le ha diagnosticado que padece de la enfermedad, trastorno y/o afección relevante. En algunas modalidades, el tratamiento puede ser de un sujeto conocido por tener uno o más factores de susceptibilidad que se correlacionan estadísticamente con un mayor riesgo de desarrollo de la enfermedad, trastorno y/o afección relevante.

El término “vector” se refiere a una molécula de ácido nucleico receptora modificada para comprender o incorporar una secuencia de ácido nucleico proporcionada. Un tipo de vector es un “plásmido”, que se refiere a una molécula de ADN bicatenario circular en la que puede ligarse ADN adicional. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde pueden ligar segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Algunos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en el que se introducen (*p. ej.*, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de vectores de mamíferos episomales y replicación). Otros vectores (*p. ej.*, vectores de mamíferos no episomales) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped tras introducirse en la célula huésped y, de esta manera, se replican junto con el genoma del huésped. Además, ciertos vectores comprenden secuencias que dirigen la expresión de genes insertados a los que se unen

operativamente. Tales vectores pueden denominarse en la presente descripción “vectores de expresión”. Pueden usarse técnicas estándar para diseñar genéticamente vectores, p. ej., como se encuentra en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), que se
5 incorpora en la presente descripción como referencia.

El término “proceso de 7 días” se refiere a un proceso de elaboración de células CAR que dura aproximadamente 7 días después de la(s) etapa(s) inicial(es) de enriquecimiento y/o activación. El proceso de 7 días tiene una duración de al menos 8 días desde la(s) etapa(s) inicial(es) de enriquecimiento y/o activación hasta una etapa de recolección, y puede durar
10 entre 8 y 11 días en total si se incluyen la(s) etapa(s) de enriquecimiento y/o activación. En algunas modalidades, no hay una etapa de activación inicial o no hay activación antes de la transducción.

El término “proceso de 5 días” se refiere a un proceso de elaboración de células CAR que dura aproximadamente 5 días después de la(s) etapa(s) inicial(es) de enriquecimiento y/o
15 activación. El proceso de 5 días tiene una duración de 6 días desde la(s) etapa(s) inicial(es) de enriquecimiento y/o activación hasta una etapa de recolección, y puede durar entre 6 y 9 días en total si se incluyen la(s) etapa(s) de enriquecimiento y/o activación. En algunas modalidades, no hay una etapa de activación inicial o no hay activación antes de la transducción.

El término “proceso de 3 días” se refiere a un proceso de elaboración de células CAR que dura aproximadamente 3 días desde la(s) etapa(s) inicial(es) de enriquecimiento y/o
20 activación. El proceso de 3 días tiene una duración de aproximadamente 4 días desde la(s) etapa(s) inicial(es) de enriquecimiento y/o activación hasta una etapa de recolección. El proceso de 3 días no incluye una etapa de expansión celular que comprenda uno o más
25 días después de una etapa de transducción y que preceda a una etapa de recolección. En algunas modalidades, no hay una etapa de activación inicial o no hay activación antes de la transducción.

En algunas modalidades, el proceso de 3 días descrito en la presente tiene una duración de aproximadamente 5 días desde la(s) etapa(s) inicial(es) de enriquecimiento y/o activación hasta una etapa de recolección. En algunas modalidades, el proceso de 3 días tiene una duración de aproximadamente 3 a 4 días o aproximadamente de 72 a 96 horas desde la(s) etapa(s) inicial(es) de enriquecimiento y/o activación hasta una etapa de recolección (p. ej., aproximadamente 72 horas, 74 horas, 76 horas, 78 horas, 80 horas, 82 horas, 84 horas, 86 horas, 88 horas, 90 horas, 92 horas, 94 horas, 96 horas de duración). En algunas modalidades, el proceso de 3 días tiene una duración de aproximadamente 4 a 5 días o aproximadamente 96 a aproximadamente 120 horas desde la(s) etapa(s) inicial(es) de enriquecimiento y/o activación hasta una etapa de recolección (p. ej., aproximadamente 96 horas, 98 horas, 100 horas, 102 horas, 104 horas, 106 horas, 108 horas, 110 horas, 112 horas, 114 horas, 116 horas, 118 horas, 120 horas de duración). En algunas modalidades, el proceso de 3 días tiene una duración de menos de 5 días o 120 horas desde la(s) etapa(s) inicial(es) de enriquecimiento y/o activación hasta una etapa de recolección.

Preparación de linfocitos diseñados por ingeniería

El proceso de elaboración de células CAR autólogas convencionales tarda aproximadamente 7 días y puede ser mucho más largo. Se creía que el largo proceso era necesario al menos debido al suministro limitado de materiales de partida, es decir, linfocitos obtenidos de una recolección por aféresis de un sujeto donante, la transducción de eficiencia relativamente baja y la necesidad de expandir las células transducidas. Ejemplos no limitantes de procesos de elaboración de células CAR se describen en WO2015120096 y WO2016191755, cada uno de los cuales se incorpora en la presente descripción en su totalidad.

Sin embargo, como se demuestra en los ejemplos adjuntos, tal un proceso largo no es necesario ni beneficioso para los pacientes. Como se muestra en la **Tabla 7**, por ejemplo, cada etapa de lavado durante el proceso de expansión redujo considerablemente la viabilidad de las células transducidas. Además, el proceso de expansión de varios días, si bien aumentó el

número total de células transducidas, redujo los porcentajes de las más juveniles (*p. ej.*, células T vírgenes, células T de memoria madre y células T de memoria central) y aumentó los porcentajes de las más maduras (*p. ej.*, células T de memoria efectora) (**Tablas 2 y 6**). Sin embargo, se demostró que los linfocitos más juveniles fueron más eficaces que los más maduros (**Tablas 5, 10 y 11**).

La descripción instantánea describe procesos mejorados que se pueden completar dentro de 5 o incluso 3 días, después de una etapa de enriquecimiento. En varios ejemplos, el proceso de 5 días incluye etapas de preparación e implementación de transducción con un mayor número de linfocitos en contacto con vectores inmovilizados en fibronectina recombinante recubierta en la superficie interna de un sistema cerrado. Tal un procedimiento de transducción mejorado permite una etapa de expansión celular postransducción mucho más abreviada. Como se muestra en la **Tabla 2**, las células transducidas preparadas a partir del proceso de 5 días se inclinaron hacia células más juveniles. Los resultados de eficacia antitumoral *in vivo* se muestran en la (**Tabla 5**).

Sin embargo, un proceso mejorado aún más, que no requiere expansión postransducción en absoluto, se puede completar dentro de solo 3 días, después de una etapa de enriquecimiento. Sorprendentemente, en comparación con el proceso de 5 días, este proceso de 3 días genera una población de células con un mayor porcentaje de células juveniles y un menor porcentaje de células más maduras, diferenciadas y activadas (en comparación con la **Tabla 6** con la **Tabla 2**). En consecuencia, no solo los productos celulares del proceso de 3 días mostraron la mejor eficacia antitumoral *in vivo*, sino que incluso se podría lograr una eficacia tan mejorada con dosis mucho más bajas (**Tablas 10-11**).

Aun en otro descubrimiento sorprendente, si bien el proceso acelerado de preparación de linfocitos mejoró la eficacia de todos los tipos de CAR sometidos a pruebas, fue particularmente más beneficioso para las moléculas de CAR con un dominio coestimulador CD28 (en comparación con aquellas con un dominio coestimulador 4-1BB) (**Tabla 13**).

Por lo tanto, de acuerdo con una modalidad de la presente descripción, se proporciona un método para preparar linfocitos transducidos (o transfectados, de la misma manera). En algunas modalidades, el método implica incubar una muestra de linfocitos con un vector polinucleotídico para transducir los linfocitos para producir linfocitos transducidos y cultivar la muestra que contiene los linfocitos transducidos antes de que los linfocitos se recolecten para producir una muestra recolectada.

En algunas modalidades, la etapa de cultivo se acorta en comparación con el proceso convencional que dura aproximadamente 4 días. En alguna modalidad, la etapa de cultivo se completa dentro de 96 horas, o dentro de 72 horas, 60 horas, 50 horas, 48 horas, 42 horas, 36 horas, 30 horas, 29 horas, 28 horas, 27 horas, 26 horas, 25 horas, 24 horas, 23 horas, 22 horas, 21 horas, 20 horas, 19 horas, 18 horas, 17 horas, 16 horas, 15 horas, 14 horas, 13 horas, 12 horas, 11 horas, 10 horas, 9 horas, 8 horas, 7 horas, 6 horas, 5 horas, o 4 horas.

En algunas modalidades, el tiempo para la etapa de cultivo se cuenta desde la finalización de la etapa de transducción (*p. ej.*, eliminación de las células del sistema con vectores inmovilizados) hasta la recolección de las células para su almacenamiento, transporte o uso clínico.

El cultivo de linfocitos transducidos se puede realizar en medios y condiciones conocidos en la técnica. En algunas modalidades, el cultivo de los linfocitos transducidos se puede realizar a una temperatura y/o en presencia de CO₂. En ciertas modalidades, la temperatura puede ser de aproximadamente 34 °C, aproximadamente 35 °C, aproximadamente 36 °C, aproximadamente 37 °C, aproximadamente 38 °C, o aproximadamente 39 °C. En ciertas modalidades, la temperatura puede ser de aproximadamente 34-39 °C. En ciertas modalidades, la temperatura predeterminada puede ser de aproximadamente 35-37 °C. En ciertas modalidades, la temperatura predeterminada preferida puede ser de aproximadamente 36-38 °C. En ciertas modalidades, la temperatura predeterminada puede ser de aproximadamente 36-37 °C o con mayor preferencia aproximadamente 37 °C.

En algunas modalidades, el cultivo de los linfocitos transducidos se puede realizar en la presencia de un nivel predeterminado de CO₂. En ciertas modalidades, el nivel predeterminado de CO₂ puede ser 1,0-10 % de CO₂. En ciertas modalidades, el nivel predeterminado de CO₂ puede ser aproximadamente 1,0 %, aproximadamente 2,0 %, aproximadamente 3,0 %, aproximadamente 4,0 %, aproximadamente 5,0 %, aproximadamente 6,0 %, aproximadamente 7,0 %, aproximadamente 8,0 %, aproximadamente 9,0 %, o aproximadamente 10,0 % de CO₂. En ciertas modalidades, el nivel predeterminado de CO₂ puede ser aproximadamente 4,5-5,5 % de CO₂. En ciertas modalidades, el nivel predeterminado de CO₂ puede ser aproximadamente 5 % de CO₂. En ciertas modalidades, el nivel predeterminado de CO₂ puede ser aproximadamente 3,5 %, aproximadamente 4,0 %, aproximadamente 4,5 %, aproximadamente 5,0 %, aproximadamente 5,5 % o aproximadamente 6,5 % de CO₂. En algunas modalidades, la etapa de expandir la población de células T transducidas se puede realizar a una temperatura predeterminada y/o en la presencia de un nivel predeterminado de CO₂ en cualquier combinación. Por ejemplo, en una modalidad, la etapa de expandir la población de células T transducidas puede comprender una temperatura predeterminada de aproximadamente 36 a 38 °C y en la presencia de un nivel predeterminado de CO₂ de aproximadamente 4,5 a 5,5 % de CO₂.

Se puede usar cualquier medio de cultivo adecuado para el medio de crecimiento de células T para cultivar las células en suspensión. Por ejemplo, un medio de crecimiento de células T puede incluir, pero no se limita a, una solución estéril baja en glucosa que incluye una cantidad adecuada de regulador, magnesio, calcio, piruvato de sodio y bicarbonato de sodio. En una modalidad, el medio de cultivo es OptMizer™ (Life Technologies), pero un experto en la técnica entendería cómo generar medios similares. En una modalidad, el medio de cultivo es medio libre de suero EX-VIVO™ (Lonza Bioscience).

La etapa de incubación (y/o transducción) se puede realizar en un sistema cerrado, sin limitación. En ciertas modalidades, el sistema cerrado es un sistema de cultivo en bolsa cerrado, usando cualquier bolsa de cultivo celular adecuada (p. ej., bolsas de diferenciación

celular GMP Mitenyi Biotec MACS®, bolsas de cultivo celular Origen Biomedical PermaLife™).

En algunas modalidades, el sistema cerrado tiene un área de superficie interna de al menos 500 cm². En algunas modalidades, el sistema cerrado tiene un área de superficie interna de al menos 1000 cm², 1200 cm², 1400 cm², 1500 cm², 1600 cm², 1800 cm², 2000 cm², 2200 cm²,
 5 2500 cm², o 3000 cm². En algunas modalidades, el sistema cerrado tiene una superficie interna de no más de 1500 cm², 1600 cm², 1800 cm², 2000 cm², 2200 cm², 2500 cm², o 3000 cm².

En algunas modalidades, las bolsas de cultivo celular usadas en el sistema cerrado se recubren con una proteína de fibronectina humana recombinante. El fragmento de fibronectina humana recombinante puede incluir tres dominios funcionales: un dominio

10 central de unión a células, dominio de unión a heparina II, y una secuencia CS1. La proteína de fibronectina humana recombinante o fragmento de esta se puede usar para aumentar la eficiencia del gen de la transducción viral de células inmunitarias al ayudar a la colocación de las células diana o del vector. En ciertas modalidades, el fragmento de fibronectina humana recombinante es RetroNectin® (Takara Bio, Japón). En ciertas

15 modalidades, las bolsas de cultivo celular se pueden recubrir con fragmento de fibronectina humana recombinante a una concentración de aproximadamente 0,1-60 µg/ml, preferentemente 0,5-40 µg/ml. En ciertas modalidades, las bolsas de cultivo celular se pueden recubrir con fragmento de fibronectina humana recombinante a una concentración de aproximadamente 0,5-20 µg/ml, 20-40 µg/ml, o 40-60 µg/ml. En ciertas modalidades,

20 las bolsas de cultivo celular se pueden recubrir con aproximadamente 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, aproximadamente 2 µg/ml, aproximadamente 3 µg/ml, aproximadamente 4 µg/ml, aproximadamente 5 µg/ml, aproximadamente 6 µg/ml, aproximadamente 7 µg/ml, aproximadamente 8 µg/ml, aproximadamente 9 µg/ml, aproximadamente 10 µg/ml, aproximadamente 11 µg/ml, aproximadamente 12 µg/ml, aproximadamente 13 µg/ml,
 25 aproximadamente 14 µg/ml, aproximadamente 15 µg/ml, aproximadamente 16 g/ml, aproximadamente 17 µg/ml, aproximadamente 18 µg/ml, aproximadamente 19 µg/ml, o aproximadamente 20 µg/ml de fragmento de fibronectina humana recombinante. En ciertas

modalidades, las bolsas de cultivo celular se pueden recubrir con aproximadamente 2–5 µg/ml, aproximadamente 2–10 µg/ml, aproximadamente 2–20 µg/ml, aproximadamente 2–25 µg/ml, aproximadamente 2–30 µg/ml, aproximadamente 2–35 µg/ml, aproximadamente 2–40 µg/ml, aproximadamente 2–50 µg/ml, o aproximadamente 2–60 µg/ml de fragmento de fibronectina humana recombinante. En ciertas modalidades, las bolsas de cultivo celular se pueden recubrir con al menos aproximadamente 2 µg/ml, al menos aproximadamente 5 µg/ml, al menos aproximadamente 10 µg/ml, al menos aproximadamente 15 µg/ml, al menos aproximadamente 20 µg/ml, al menos aproximadamente 25 µg/ml, al menos aproximadamente 30 µg/ml, al menos aproximadamente 40 µg/ml, al menos aproximadamente 50 µg/ml, o al menos aproximadamente 60 µg/ml de fragmento de fibronectina humana recombinante. En ciertas modalidades, las bolsas de cultivo celular se pueden recubrir con al menos aproximadamente 10 µg/ml de fragmento de fibronectina humana recombinante. En ciertas modalidades, las bolsas de cultivo celular pueden no estar recubiertas con fragmento de fibronectina humana recombinante.

En algunas modalidades, se introduce un agente potenciador de la transducción en el sistema cerrado. Los ejemplos no limitantes de tales agentes potenciadores de la transducción incluyen mezclas de transducción Vectofusin™.

En ciertas modalidades, las bolsas de cultivo celular usadas en el sistema de cultivo de bolsa cerrado se pueden bloquear con suero de albúmina humana (HSA, por sus siglas en inglés). En una modalidad alternativa, las bolsas de cultivo celular no se bloquean con HSA. Una vez que el sistema cerrado se recubre con la fibronectina recombinante, se añade al sistema cerrado una solución que incluye el vector para que el vector pueda ser inmovilizado por la fibronectina recombinante, en la superficie interna del sistema cerrado. Tal inmovilización puede mejorar la eficiencia de la transducción una vez que se añaden las células.

En algunas modalidades, los vectores pueden ser vectores virales, tales como vectores lentivirales, así como vectores retrovirales. Se han usado varios virus recombinantes como

vectores virales para suministrar material genético a una célula. Los vectores virales que pueden usarse de acuerdo con la etapa de transducción pueden ser cualquier vector viral ecotrópico o anfotrópico que incluye, pero no se limita a, vectores retrovirales recombinantes, vectores lentivirales recombinantes, vectores adenovirales recombinantes y vectores virales adenoasociados (AAV, por sus siglas en inglés) recombinantes. En una modalidad, el vector viral es un vector retroviral gamma MSGV1. En algunas modalidades, los vectores son vectores no virales.

En algunas modalidades, se usa un volumen total de al menos 100 ml de la solución que contiene el vector. En algunas modalidades, se usa un volumen total de al menos 110 ml, 120 ml, 130 ml, 140 ml, 150 ml, 160 ml, 170 ml, 180 ml, 190 ml, 200 ml, 210 ml, 220 ml, 230 ml, 240 ml, 250 ml, 260 ml, 270 ml, 280 ml, 290 ml, 300 ml, 350 ml, o 400 ml de la solución que contiene el vector. En algunas modalidades, se usa un volumen total de no más de 150 ml, 160 ml, 170 ml, 180 ml, 190 ml, 200 ml, 210 ml, 220 ml, 230 ml, 240 ml, 250 ml, 260 ml, 270 ml, 280 ml, 290 ml, 300 ml, 350 ml, 400 ml, o 500 ml de la solución que contiene el vector.

En algunas modalidades, la solución del vector incluye entre 1×10^3 a 1×10^{12} unidades de transducción por mililitro (TU/ml) del vector viral.

Una vez que el sistema cerrado se recubre con fibronectina recombinante y ha inmovilizado el vector, se puede eliminar la solución del vector. En algunas modalidades, el sistema cerrado no incluye fibronectina recombinante. En algunas modalidades, la eliminación de la solución del vector se realiza por gravedad o drenaje con jeringa, lo que ayuda a retener el vector inmovilizado en la superficie interna mientras se eliminan las impurezas. La transducción de linfocitos se puede llevar en el sistema cerrado recubierto con los vectores inmovilizados. En algunas modalidades, la transducción se realiza con una muestra que contenía los linfocitos. En algunas modalidades, la muestra incluye al menos $2,5 \times 10^7$ linfocitos (p. ej., células T). En algunas modalidades, la muestra incluye al menos 3×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 , $1,2 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, 2×10^8 ,

2,2 x 10⁸, 2,5 x 10⁸, 2,6 x 10⁸, 2,7 x 10⁸, 2,8 x 10⁸, 2,9 x 10⁸, 3 x 10⁸, 3,1 x 10⁸, 3,2 x 10⁸, 3,3 x 10⁸, 3,4 x 10⁸, 3,5 x 10⁸, 3,6 x 10⁸, 3,7 x 10⁸, 3,8 x 10⁸, 3,9 x 10⁸, 4 x 10⁸, 4,1 x 10⁸, 4,2 x 10⁸, 4,3 x 10⁸, 4,4 x 10⁸, 4,5 x 10⁸, 4,6 x 10⁸, 4,7 x 10⁸, 4,8 x 10⁸, 4,9 x 10⁸, 5 x 10⁸, 5,1 x 10⁸, 5,2 x 10⁸, 5,3 x 10⁸, 5,4 x 10⁸, 5,5 x 10⁸, 5,6 x 10⁸, 5,7 x 10⁸, 5,8 x 10⁸, 5,9 x 10⁸, 6 x 10⁸, 6,1 x 10⁸, 6,2 x 10⁸, 6,3 x 10⁸, 6,4 x 10⁸, 6,5 x 10⁸, 6,6 x 10⁸, 6,7 x 10⁸, 6,8 x 10⁸, 6,9 x 10⁸, 7 x 10⁸, 7,5 x 10⁸, 8 x 10⁸, 9 x 10⁸, or 10 x 10⁸ linfocitos (*p. ej.*, células T). En algunas modalidades, la muestra incluye no más de 3 x 10⁸, 3,1 x 10⁸, 3,2 x 10⁸, 3,3 x 10⁸, 3,4 x 10⁸, 3,5 x 10⁸, 3,6 x 10⁸, 3,7 x 10⁸, 3,8 x 10⁸, 3,9 x 10⁸, 4 x 10⁸, 4,1 x 10⁸, 4,2 x 10⁸, 4,3 x 10⁸, 4,4 x 10⁸, 4,5 x 10⁸, 4,6 x 10⁸, 4,7 x 10⁸, 4,8 x 10⁸, 4,9 x 10⁸, 5 x 10⁸, 5,1 x 10⁸, 5,2 x 10⁸, 5,3 x 10⁸, 5,4 x 10⁸, 5,5 x 10⁸, 5,6 x 10⁸, 5,7 x 10⁸, 5,8 x 10⁸, 5,9 x 10⁸, 6 x 10⁸, 6,1 x 10⁸, 6,2 x 10⁸, 6,3 x 10⁸, 6,4 x 10⁸, 6,5 x 10⁸, 6,6 x 10⁸, 6,7 x 10⁸, 6,8 x 10⁸, 6,9 x 10⁸, 7 x 10⁸, 7,5 x 10⁸, 8 x 10⁸, 9 x 10⁸, or 10 x 10⁸ linfocitos (*p. ej.*, células T).

En algunas modalidades, la transducción de linfocitos se realiza en un sistema cerrado que no contiene un agente inmovilizante (*p. ej.*, fibronectina recombinante).

Los linfocitos usados en los métodos actualmente descritos se obtienen típicamente de un sujeto donante, que puede ser un paciente con cáncer que se tratará con una población de células generadas mediante los métodos descritos en la presente (es decir, un donante autólogo), o puede ser un individuo que dona una muestra de linfocitos que, después de la generación de la población de células generadas mediante los métodos descritos en la presente, se usará para tratar a un individuo o paciente con cáncer diferente (es decir, un donante alogénico). Los linfocitos se pueden obtener del sujeto donante mediante cualquier método adecuado usado en la técnica. Por ejemplo, los linfocitos se pueden obtener mediante cualquier método extracorpóreo adecuado, venopunción u otro método de recolección de sangre mediante el cual se obtiene una muestra de sangre y/o linfocitos. En una modalidad, los linfocitos se obtienen mediante aféresis.

Opcionalmente, en algunas modalidades, el método descrito en la presente incluye además una etapa de enriquecimiento de una población de linfocitos obtenidos del sujeto donante,

antes de la transducción. El enriquecimiento de linfocitos se puede lograr mediante cualquier método de separación adecuado que incluye, pero no se limita a, el uso de un medio de separación (*p. ej.*, Ficoll-Paque™, cóctel de enriquecimiento de linfocitos totales RosetteSep™ HLA, medio de separación de linfocitos (LSA, por sus siglas en inglés) (MP Biomedical Cat. núm. 0850494X), un medio no iónico basado en iodixanol tal como OptiPrep™, o lo similar), separación por tamaño, forma o densidad de la célula mediante separación por filtración, elutriación o inmunomagnética (*p. ej.*, sistema de clasificación de células activadas magnéticamente, MACS), separación fluorescente (*p. ej.*, sistema de clasificación de células activadas por fluorescencia, FACS), o separación en columna basada en glóbulos.

- 5
- 10 Opcionalmente, en algunas modalidades, las células de linfoma circulantes se eliminan de la muestra mediante enriquecimiento positivo para células CD4⁺/CD8⁺ mediante el uso de reactivos de selección. En algunas de tales modalidades, después de la incubación con los reactivos de selección, las células incubadas, incluidas las células a las que se ha unido el reactivo de selección, se transfieren a un sistema para la separación de las células basada
- 15 en inmunoafinidad. En algunas modalidades, el sistema para la separación basada en inmunoafinidad es o contiene una columna de separación magnética.

- En algunas de tales modalidades, los métodos de aislamiento incluyen la separación de diferentes tipos de células basados en la expresión o presencia en la célula de una o más moléculas específicas, tales como marcadores de superficie, *p. ej.*, proteínas de superficie,
- 20 marcadores intracelulares o ácido nucleico. En algunas modalidades, se puede usar cualquier método conocido para la separación basado en tales marcadores. En algunas modalidades, la separación es una separación basada en afinidad o inmunoafinidad. Por ejemplo, el aislamiento en algunas modalidades incluye la separación de células y poblaciones celulares basadas en la expresión de las células o el nivel de expresión de uno o más marcadores,
- 25 típicamente marcadores de la superficie celular, por ejemplo, mediante incubación con un anticuerpo o compañero de unión que se une específicamente a tales marcadores, seguidos generalmente de etapas de lavado y separación de las células que se han unido al anticuerpo

o al compañero de unión, de aquellas células que no se han unido al anticuerpo o al compañero de unión. Tales etapas de separación se pueden basar en una selección positiva, en la que las células que se han unido a los reactivos se retienen para su uso posterior, y/o en una selección negativa, en la que se retienen las células que no se han unido al anticuerpo o al compañero de unión. En algunos ejemplos, ambas fracciones se retienen para su uso posterior.

En algunas tales modalidades, 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 tal manera que la separación se realiza mejor basándose en marcadores expresados por células distintas de la población deseada.

10 No es necesario que la separación resulte en un enriquecimiento o eliminación de 100 % de una población de células particular o de células que expresan un marcador particular. Por ejemplo, la selección positiva o el enriquecimiento de células de un tipo particular, tales como aquellas que expresan un marcador, se refiere a aumentar el número o porcentaje de tales células, pero no necesariamente resulta en una ausencia completa de células que no expresan el marcador. Similarmente, la selección negativa, la
15 eliminación o el agotamiento de células de un tipo particular, tales como las que expresan un marcador, se refiere a la disminución del número o porcentaje de tales células, pero no tiene por qué resultar en una eliminación completa de todas tales células.

En algunos ejemplos, se realizan múltiples rondas de etapas de separación, donde la fracción seleccionada positiva o negativamente de una etapa se somete a otra etapa de separación, tal como una selección positiva o negativa posterior. En algunos ejemplos, una
20 única etapa de separación puede agotar las células que expresan múltiples marcadores simultáneamente, tales como incubando células con una pluralidad de anticuerpos o compañeros de unión, cada uno específico para un marcador diana de selección negativa. Similarmente, se pueden seleccionar positivamente múltiples tipos de células
25 simultáneamente incubando células con una pluralidad de anticuerpos o compañeros de unión expresados en los diversos tipos de células.

Por ejemplo, en algunas modalidades, subpoblaciones específicas de células T, tales como células positivas o que expresan altos niveles de uno o más marcadores de superficie, p. ej., células T CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ y/o CD45RO+, se aíslan mediante técnicas de selección positiva o negativa. Por ejemplo, las células T CD3+,
 5 CD28+ se pueden seleccionar positivamente usando perlas magnéticas conjugadas anti-CD3/anti-CD28 (p. ej., expensor de células T CD3/CD28 DYNABEADS® M-450). En algunas modalidades, la población de células se enriquece para células T con fenotipo virgen (CD45RA+ CCR7+).

En algunas modalidades, el aislamiento se realiza mediante enriquecimiento para una
 10 población de células particular mediante selección positiva, o agotamiento de una población de células particular, mediante selección negativa. En algunas modalidades, 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 (marcador+) en un nivel relativamente más alto expresado (marcador alto)
 15 en las celdas seleccionadas positiva o negativamente, respectivamente.

En modalidades particulares, una muestra biológica, p. ej., una muestra de PBMC u otros glóbulos blancos, se somete a selección de células T CD4+, donde se retienen tanto la fracción negativa como la positiva. En ciertas modalidades, las células T CD8+ se seleccionan de la fracción negativa. En algunas modalidades, una muestra biológica se
 20 somete a selección de células T CD8+, donde se retienen tanto las fracciones negativa como positiva. En ciertas modalidades, las células T CD4+ se seleccionan de la fracción negativa.

En algunas modalidades, las células T se separan de una muestra de PBMC mediante selección negativa de marcadores expresados en células no T, tales como células B,
 25 monocitos u otros glóbulos blancos, tales como CD14. En algunas modalidades, se usa una etapa de selección CD4+ o CD8+ para separar células T CD4+ ayudantes y CD8+ citotóxicas. Tales poblaciones CD4+ y CD8+ se pueden clasificar además en

subpoblaciones mediante selección positiva o negativa de marcadores expresados o expresados en un grado relativamente mayor en una o más subpoblaciones de células T vírgenes, de memoria y/o efectoras.

En un ejemplo, para enriquecer células CD4⁺ mediante selección negativa, un cóctel de anticuerpos monoclonales típicamente incluye anticuerpos contra CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR y CD8. En algunas modalidades, el anticuerpo o compañero de unión se une a un soporte o matriz sólido, 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 algunas modalidades, las células y las poblaciones de células se separan o aíslan usando técnicas de separación inmunomagnética (o magnética de afinidad). En algunas modalidades, la muestra o composición de células que se van a separar se incuba con material pequeño, magnetizable o magnéticamente sensible, tal como partículas o micropartículas magnéticamente sensibles, tales como perlas paramagnéticas (p. ej., tales como DynabeadsTM o las perlas MACS). El material magnéticamente sensible, p. ej., partícula, generalmente se acopla 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 algunas modalidades, la partícula o perla magnética comprende un material magnéticamente sensible unido a un miembro de unión específico, tal como un anticuerpo u otro compañero de unión. Hay muchos materiales magnéticamente sensibles bien conocidos que se usan en métodos de separación magnética. La incubación generalmente se realiza en condiciones en las que los anticuerpos o compañeros de unión, o moléculas, tales como anticuerpos secundarios u otros reactivos, que se unen específicamente a tales anticuerpos o compañeros de unión, que se acoplan 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 algunas modalidades, la muestra se coloca en un campo magnético, y aquellas células que tienen partículas magnéticamente sensibles o magnetizables acopladas con esta serán atraídas por el imán y separadas de las células no marcadas. Para la selección positiva, se retienen las células que son atraídas por el imán; para la selección negativa, se

5 retienen las celdas que no son atraídas (celdas sin etiquetar). En algunas modalidades, se realiza una combinación de selección positiva y negativa durante la misma etapa de selección, donde las fracciones positivas y negativas se retienen y se procesan adicionalmente o se someten a etapas de separación adicionales. En algunas modalidades, las partículas magnéticamente sensibles se recubren de anticuerpos primarios u otros socios de unión,

10 anticuerpos secundarios, lectinas, enzimas o estreptavidina. En ciertas modalidades, las partículas magnéticas se acoplan a las células mediante un recubrimiento de anticuerpos primarios específicos para uno o más marcadores. En ciertas modalidades, las células, en lugar de las perlas, se marcan con un anticuerpo primario o compañero de unión, y después se añaden partículas magnéticas recubiertas con anticuerpo secundario específico de tipo

15 celular u otro compañero de unión (p. ej., estreptavidina). En ciertas modalidades, las partículas magnéticas recubiertas de estreptavidina se usan junto con anticuerpos primarios o secundarios biotinilados. En algunas modalidades, las partículas magnéticamente sensibles se dejan acopladas a las células que se van a incubar, cultivar y/o diseñar por ingeniería

20 su administración a un paciente. En algunas modalidades, las partículas magnetizables o magnéticamente sensibles se eliminan de las células. Se conocen métodos para eliminar partículas magnetizables de las células e incluyen, p. ej., el uso de anticuerpos no marcados competitivos y partículas magnetizables o anticuerpos conjugados con conectores escindibles. En algunas modalidades, las partículas magnetizables son biodegradables.

25 En algunas modalidades, la selección basada en la afinidades mediante la clasificación de células activadas magnéticamente (MACS, por sus siglas en inglés) (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 acopladas con esta. En ciertas modalidades, MACS opera en un modo en donde las especies no diana y diana se eluyen secuencialmente después de la aplicación del campo magnético externo. Es decir, las células acopladas a las partículas magnetizadas se mantienen en su lugar mientras las especies no acopladas se eluyen. Entonces, una vez completado esta primera etapa de elución, las especies que quedaron atrapadas en el campo magnético y a las que se les impidió ser eluidas se liberan de alguna manera de tal manera que puedan ser eluidas y recuperadas. En ciertas modalidades, las células no diana se etiquetan y se agotan de la población heterogénea de células.

En algunas modalidades, el aislamiento o separación se lleva a cabo usando un sistema, dispositivo o aparato que se realiza una o más de las etapas de aislamiento, preparación celular, separación, procesamiento, incubación, cultivo y/o formulación de los métodos. En algunas modalidades, el sistema se usa para realizar cada una de estas etapas en un entorno cerrado o estéril, por ejemplo, para minimizar errores, manipulación por parte del usuario y/o contaminación. En un ejemplo, el sistema es un sistema como se describe en la solicitud de patente internacional, publicación núm. W02009/072003 o US 20110003380 A1, cada uno de los cuales se incorpora en la presente descripción como referencia. En algunas modalidades, el sistema o aparato realiza uno o más, p. ej., de las etapas de aislamiento, procesamiento, ingeniería y formulación en un sistema integrado o autónomo, y/o de forma automatizada o programable. En algunas modalidades, el sistema o aparato incluye una computadora y/o programa informático en comunicación con el sistema o aparato, lo que permite a un usuario programar, controlar, evaluar el resultado de, y/o ajustar diversas modalidades de las etapas de procesamiento, aislamiento, ingeniería y formulación. En algunas modalidades, la separación y/u otras etapas se realizan usando el sistema CliniMACS (Miltenyi Biotec), por ejemplo, para la separación automatizada de células a nivel de escala clínica en un sistema cerrado y estéril. Los componentes pueden incluir una microcomputadora integrada, una unidad de separación magnética, una bomba

peristáltica y varias válvulas de pinza. La computadora integrada en algunas modalidades controla los componentes del instrumento y dirige el sistema para que realice procedimientos repetidos en una secuencia estandarizada. La unidad de separación magnética en algunas modalidades incluye un imán permanente móvil y un soporte para la columna de selección. La bomba peristáltica controla la tasa de flujo a lo largo del conjunto de tubos y, junto con las válvulas de pinza, garantiza el flujo controlado del regulador a través del sistema y la suspensión continua de las células.

El sistema CliniMACS en algunas modalidades usa partículas magnetizables acopladas a anticuerpos que se suministran en una solución estéril y apirógena. En algunas modalidades, después de marcar las células con partículas magnéticas, las células se lavan para eliminar el exceso de partículas. Después, se conecta una bolsa de preparación de células al conjunto de tubos, que a su vez se conecta a una bolsa que contiene regulador y una bolsa de recolección de células. El conjunto de tubos consta de tubos estériles premontados, que incluyen una precolumna y una columna de separación, y son para un solo uso. Después del inicio del programa de separación, el sistema aplica automáticamente la muestra celular en la columna de separación. Las células marcadas se retienen dentro de la columna, mientras que las células no marcadas se eliminan mediante una serie de etapas de lavado. En algunas modalidades, las poblaciones de células para usar con los métodos descritos en la presente no se marcan y no se retienen en la columna. En algunas modalidades, las poblaciones de células para usar con los métodos descritos en la presente se marcan y se retienen en la columna. En algunas modalidades, las poblaciones de células para usar con los métodos descritos en la presente se eluyen de la columna después de la eliminación del campo magnético y se recolectan dentro de la bolsa de recolección de células.

En ciertas modalidades, la separación y/u otras etapas se realizan usando el sistema CliniMACS Prodigy (Miltenyi Biotec). El sistema CliniMACS Prodigy en algunas modalidades se equipa con una unidad de procesamiento celular que permite el lavado y fraccionamiento automatizado de células mediante centrifugación. El sistema CliniMACS

Prodigy también puede incluir una cámara integrada y un software de reconocimiento de imágenes que determina el criterio de valoración óptimo de fraccionamiento celular al discernir las capas macroscópicas del producto celular de origen. Por ejemplo, la sangre periférica se separa automáticamente en eritrocitos, glóbulos blancos y capas de plasma.

5 El sistema CliniMACS Prodigy también puede incluir una cámara de cultivo celular integrada que cumple protocolos de cultivo celular tal como, p. ej., diferenciación y expansión celular, carga de antígeno y cultivo celular a largo plazo. Los puertos de entrada pueden permitir la extracción estéril y la reposición de medios y las células se pueden controlar usando un microscopio integrado.

10 En algunas modalidades, una población celular descrita en la presente se recolecta y se enriquece (o se agota) mediante citometría de flujo, en la que las células teñidas para múltiples marcadores de superficie celular se transportan en una corriente fluidica. En algunas modalidades, una población celular descrita en la presente se recolecta y se enriquece (o se agota) mediante la clasificación a escala preparativa (FACS). En ciertas modalidades, una
15 población celular descrita en la presente se recolecta y se enriquece (o se agota) mediante el uso de chips de sistemas microelectromecánicos (MEMS, por sus siglas en inglés) en combinación con un sistema de detección basado en FACS (ver, p. ej., WO 2010/033140, Cho et al. (2010) Lab Chip 10, 1567-1573; and Godin et al. (2008) J Biophoton. 1(5):355-376. En ambos casos, las células se pueden marcar con múltiples marcadores, lo que permite el
20 aislamiento de subconjuntos de células T bien definidos con alta pureza.

En algunas modalidades, los anticuerpos o parejas de unión se etiquetan con uno o más marcadores detectables, para facilitar la separación para la selección positiva y/o negativa. Por ejemplo, la separación se puede basar en la unión a anticuerpos etiquetados fluorescentemente. En algunos ejemplos, la separación de células basada en la unión de
25 anticuerpos u otros compañeros de unión específicos para uno o más marcadores de superficie celular se realiza en una corriente fluidica, tal como mediante la clasificación de células activada por fluorescencia (FACS), que incluye la escala preparativa (FACS) y/o

los chips de sistemas microelectromecánicos (MEMS), p. ej., en combinación con un sistema de detección de citometría de flujo. Tales métodos permiten la selección positiva y negativa basada en múltiples marcadores simultáneamente.

En algunas modalidades, al menos $0,5 \times 10^9$ linfocitos se adquieren del donante, y opcionalmente se enriquecen y/o se someten a la estimulación. En algunas modalidades, al menos $0,6 \times 10^9$, $0,7 \times 10^9$, $0,8 \times 10^9$, $0,9 \times 10^9$, 1×10^9 , $1,1 \times 10^9$, $1,2 \times 10^9$, $1,3 \times 10^9$, $1,4 \times 10^9$, $1,5 \times 10^9$, $1,6 \times 10^9$, $1,7 \times 10^9$, $1,8 \times 10^9$, $1,9 \times 10^9$, 2×10^9 , $2,5 \times 10^9$, o 3×10^9 son linfocitos adquiridos del donante, y se enriquecen opcionalmente y/o someten a la estimulación. En algunas modalidades, no más de 1×10^9 , $1,1 \times 10^9$, $1,2 \times 10^9$, $1,3 \times 10^9$, $1,4 \times 10^9$, $1,5 \times 10^9$, $1,6 \times 10^9$, $1,7 \times 10^9$, $1,8 \times 10^9$, $1,9 \times 10^9$, 2×10^9 , $2,5 \times 10^9$, o 3×10^9 son linfocitos adquiridos del donante, y se enriquecen opcionalmente y/o someten a la estimulación.

También opcionalmente, los métodos descritos en la presente incluyen además una etapa de estimulación de los linfocitos con uno o más agentes estimulantes de linfocitos. En algunas modalidades, la estimulación se realiza antes de la etapa de transducción. En algunas modalidades, la estimulación se realiza después de la etapa de transducción. La etapa de estimulación también se denomina en la presente descripción etapa de activación. Se puede usar cualquier combinación de uno o más agentes estimulantes de linfocitos adecuados para estimular (activar) los linfocitos. Los ejemplos no limitantes incluyen un anticuerpo o fragmento funcional de este que se dirige a una molécula estimuladora o coestimuladora de células T (p. ej., anticuerpo anti-CD2, anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD28 o fragmentos funcionales de estos), una citocina de células T (p. ej., cualquier citocina aislada, silvestre o recombinante, tales como: interleucina 1 (IL-1), interleucina 2, (IL-2), interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 7 (IL-7), interleucina 15 (IL-15), factor de necrosis tumoral α (TNF α)) o cualquier otro mitógeno adecuado (p. ej., acetato de tetradecanoilforbol (TPA, por sus siglas en inglés), fitohemaglutinina (PHA, por sus siglas en inglés), concanavalina A (conA, por sus siglas en inglés), lipopolisacárido (LPS, por sus siglas

en inglés), mitógeno de hierba carmín (PWM, por sus siglas en inglés)) o ligando natural a una molécula estimuladora o coestimuladora de células T. En algunas modalidades, el agente estimulante es un anticuerpo anti-CD3 y/o un anticuerpo anti-CD28.

En algunas modalidades, el agente estimulante de linfocitos puede ser un activador basado en perlas, tal como TransAct™ de células T (Miltenyi Biotec), Dynabeads® (Thermo Fisher Scientific) o kit de activación de células T Cloudz™ (R&D Systems).

En algunas modalidades, la etapa de estimular los linfocitos como se describe en la presente puede implicar estimular los linfocitos con uno o más agentes estimulantes a una temperatura predeterminada, durante un período de tiempo predeterminado y/o en la presencia de un nivel

predeterminado de CO₂. En ciertas modalidades, la temperatura predeterminada para la estimulación puede ser aproximadamente 34 °C, aproximadamente 35 °C, aproximadamente 36 °C, aproximadamente 37 °C, aproximadamente 38 °C o aproximadamente 39 °C. En ciertas modalidades, la temperatura predeterminada para la estimulación puede ser aproximadamente 34-39 °C. En ciertas modalidades, la etapa de estimular los linfocitos

comprende estimular los linfocitos con uno o más agentes estimulantes durante un tiempo predeterminado. En ciertas modalidades, el tiempo predeterminado para la estimulación puede ser aproximadamente 24-72 horas. En ciertas modalidades, el tiempo predeterminado para la estimulación puede ser aproximadamente 24-36 horas. En ciertas modalidades, la etapa de estimular los linfocitos puede comprender estimular los linfocitos con uno o más agentes

estimulantes en la presencia de un nivel predeterminado de CO₂. En ciertas modalidades, el nivel predeterminado de CO₂ para la estimulación puede ser aproximadamente 1,0-10 % de CO₂. En ciertas modalidades, el nivel predeterminado de CO₂ para la estimulación puede ser

aproximadamente 1,0 %, aproximadamente 2,0 %, aproximadamente 3,0 %, aproximadamente 4,0 %, aproximadamente 5,0 %, aproximadamente 6,0 %, aproximadamente 7,0 %, aproximadamente 8,0 %, aproximadamente 9,0 %, o aproximadamente 10,0 % de CO₂.

En algunas modalidades, se puede usar un anticuerpo anti-CD3 (o fragmento funcional de este), un anticuerpo anti-CD28 (o fragmento funcional de este) o una combinación de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 de acuerdo con la etapa de estimulación de la población de linfocitos. Se puede usar cualquier anticuerpo anti-CD3 y/o anti-CD28 soluble o inmovilizado o fragmento funcional de estos (*p. ej.*, clon OKT3 (anti-CD3), clon 145-2C11 (anti-CD3), clon UCHT1 (anti-CD3), clon L293 (anti-CD28), clon 15E8 (anti-CD28). En algunos aspectos, los anticuerpos se pueden adquirir comercialmente a través de proveedores conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, Miltenyi Biotec, BD Biosciences (*p. ej.*, MACS GMP CD3 pure de 1 mg/ml, parte núm. 170-076-116), y eBioscience, Inc. Además, un experto en la técnica entenderá cómo producir un anticuerpo anti-CD3 y/o anti-CD28 mediante métodos convencionales. Cualquier anticuerpo usado en los métodos descritos en la presente se debe producir según las Buenas Prácticas de Manufactura (GMP, por sus siglas en inglés) para cumplir con las directrices de las agencias pertinentes para productos biológicos.

En ciertas modalidades, el agente estimulante de células T puede incluir un anticuerpo anti-CD3 o anti-CD28 en una concentración de aproximadamente 20 ng/ml-100 ng/ml. En ciertas modalidades, la concentración de anticuerpo anti-CD3 o anti-CD28 puede ser aproximadamente 20 ng/ml, aproximadamente 30 ng/ml, aproximadamente 40 ng/ml, aproximadamente 50 ng/ml, aproximadamente 60 ng/ml, aproximadamente 70 ng /ml, aproximadamente 80 ng/ml, aproximadamente 90 ng/ml o aproximadamente 100 ng/ml.

En algunas modalidades, un proceso de 3 días de la presente descripción puede comprender las siguientes etapas: recolección de material de aféresis, una primera etapa de lavado realizada el día 0, una segunda etapa de lavado realizada el día 0, una etapa de enriquecimiento realizada el día 0, una tercera etapa de lavado realizada el día 0, una etapa de activación realizada desde el día 0 hasta el día 1, una etapa de transducción viral realizada desde el día 1 hasta el día 4, y una cuarta etapa de lavado y concentración realizada desde el día 3 hasta el día 4 (el día de recolección). El material de aféresis puede ser material de aféresis fresco, material de aféresis criopreservado o células T crioconservadas.

En algunas modalidades, el proceso de 3 días puede comprender una etapa de activación en el día 0, día 1 o día 2. En algunas modalidades, el proceso de 3 días puede comprender una etapa de transducción de vector viral en el día 1, día 2 o día 3.

En algunas modalidades, el proceso de 3 días puede comprender opcionalmente una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más etapas de lavado. Cada etapa de lavado puede comprender el mismo procedimiento de lavado o un procedimiento de lavado diferente. En algunas modalidades, una o más etapas de lavado pueden ocurrir antes de la etapa de enriquecimiento. En algunas modalidades, el primer lavado puede ocurrir después de la etapa de enriquecimiento. En algunas modalidades, el primer lavado puede ocurrir después de la etapa de enriquecimiento y antes de la etapa de activación. En algunas modalidades, el primer lavado puede ocurrir después de las etapas de enriquecimiento y activación. En algunas modalidades, se puede realizar una etapa de lavado el día de recolección.

Linfocitos preparados diseñados por ingeniería

Los linfocitos preparados, como se demuestra en los ejemplos experimentales adjuntos, incluían relaciones más altas de juveniles (*p. ej.*, células T vírgenes). En consecuencia, una modalidad de la presente descripción proporciona una población de linfocitos, preparada por los métodos instantáneos, que incluyen células T CD4+ y CD8+.

En algunas modalidades, al menos 20 % de las células T CD4+ son células T vírgenes. En algunas modalidades, al menos 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 % o 60 % de las células T CD4+ son células T vírgenes.

En algunas modalidades, no más de 25 % de las células T CD4+ son células T de memoria efectora. En algunas modalidades, no más de 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 % o 5 % de las células T CD4+ son células T de memoria efectora.

En algunas modalidades, no más de 44 % de las células T CD4+ son células T de memoria central. En algunas modalidades, no más de 43 %, 42 %, 41 %, o 40 % de las células T CD4+ son células T de memoria central.

En algunas modalidades, no más de 1,5 % de las células T CD4+ son células T efectoras.

- 5 En algunas modalidades, no más de 1,4 %, 1,3 %, 1,2 %, 1,1 %, 1 %, 0,9 %, 0,8 %, 0,7 %, 0,6 % o 0,5 % de las células T CD4+ son células T efectoras.

En algunas modalidades, al menos 80 % de las células T CD4+ recolectadas son células CCR7+. En algunas modalidades, como máximo 20 % de las células T CD4+ recolectadas son una combinación de células T de memoria efectora y células T efectoras.

- 10 En algunas modalidades, al menos 5 % de las células T CD8+ son células T vírgenes. En algunas modalidades, al menos 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 % o 35 % de las células T CD8+ son células T vírgenes.

- En algunas modalidades, no más de 30 % de las células T CD8+ son células T de memoria efectora. En algunas modalidades, no más de 28 %, 27 %, 25 %, 22 %, 20 %, 19 %, 18 %, 15 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, o 10 % de las células T CD8+ son células T de memoria efectora.

En algunas modalidades, no más de 60 % de las células T CD8+ son células T de memoria central. En algunas modalidades, no más de 58 %, 56 %, 55 %, 54 %, 52 % o 50 % de las células T CD8+ son células T de memoria central.

- 20 En algunas modalidades, al menos 60 % de las células T CD8+ recolectadas son células CCR7+. En algunas modalidades, como máximo 40 % de las células T CD8+ recolectadas son una combinación de células T de memoria efectora y células T efectoras.

Cada tipo de células T se puede caracterizar con marcadores de superficie celular, como es bien conocido en la técnica. Por ejemplo, las células T vírgenes se pueden caracterizar como

- 25 CCR7+, CD45RO- y CD95-. Los marcadores adicionales para las células T vírgenes incluyen CD45RA+, CD62L+, CD27+, CD28+, CD127+, CD132+, CD25-, CD44- y HLA-DR-.

Los marcadores de superficie de las células T de memoria madre (Tscm, por sus siglas en inglés) incluyen, sin limitación, CD45RO-, CCR7+, CD45RA+, CD62L+ (L-selectina), CD27+, CD28+, IL-7Ra+, CD95+, IL-2RP+, CXCR3+ y LFA-.

Los marcadores de superficie para células T de memoria efectora (Tem, por sus siglas en inglés) incluyen, sin limitación, CCR7-, CD45RO+ y CD95+. El marcador adicional para las células T de memoria efectora es IL-2Rβ+. Para las células T de memoria central (Tcm, por sus siglas en inglés), los marcadores adecuados incluyen CD45RO+, CD95+, IL-2Rβ+, CCR7+ y CD62L+. Para las células T efectoras (Teff, por sus siglas en inglés), los marcadores adecuados incluyen CD45RA+, CD95+, IL-2Rβ+, CCR7- y CD62L-, sin limitación.

10 El término “células juveniles” como se refiere en todo momento incluye una o más de células T vírgenes, células T de memoria madre (Tscm) y células T de memoria central (Tcm). Estas células se caracterizan, en parte, por la expresión de CCR7+.

Los linfocitos recolectados incluyen preferentemente una buena proporción que son células T CD3+. En algunas modalidades, al menos 25 %, 35 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 15 70 %, 75 %, 80 %, 85 % o 90 % de los linfocitos recolectados son células T CD3+.

Los linfocitos recolectados incluyen preferentemente una buena proporción que se ha transducido. En algunas modalidades, al menos 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 20 40 %, 41 %, 42 %, 42 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 % o 50 % de los linfocitos recolectados se transducen con el vector. En algunas modalidades, cada linfocito transducido incluye al menos una copia del vector (o la secuencia codificante incluida) integrada en el genoma del huésped. En algunas modalidades, cada linfocito transducido incluye al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 copias del vector integrado al genoma del 25 huésped.

En algunas modalidades, el vector incluye un transgén que codifica un polipéptido. El polipéptido, sin limitación, puede ser un CAR o TCR. En algunas modalidades, el CAR o

TCR incluye una molécula de unión al antígeno. La molécula de unión al antígeno, en algunas modalidades, tiene especificidad de unión a una entidad antigénica. En algunas modalidades, la entidad antigénica es un antígeno tumoral (p. ej., una proteína u otra molécula que se produce por una célula cancerosa).

- 5 En algunas modalidades, el vector incluye más de un transgén que codifica para más de una molécula CAR o TCR que incluyen moléculas de unión al antígeno con especificidad para diferentes entidades antigénicas. En algunas modalidades, el vector incluye más de un transgén que codifica para más de una molécula CAR o TCR que incluyen moléculas de unión al antígeno con especificidad para dos antígenos tumorales diferentes.
- 10 En algunos aspectos, la entidad antigénica es un antígeno asociado a un cáncer o a una célula cancerosa. Tales antígenos pueden incluir, pero no se limitan a, 707-AP (707 alanina prolina), AFP (alfa (a)-fetoproteína), ART-4 (antígeno de adenocarcinoma reconocido por las células T4), BAGE (antígeno B; b-catenina/m, b-catenina/mutada), BCMA (antígeno de maduración de células B), Bcr-abl (región de grupo de ruptura-Abelson), CAIX (anhidrasa carbónica IX),
15 CD19 (cúmulo de diferenciación 19), CD20 (cúmulo de diferenciación 20), CD22 (cúmulo de diferenciación 22), CD30 (cúmulo de diferenciación 30), CD33 (cúmulo de diferenciación 33), CD44v7/8 (cúmulo de diferenciación 44, exones 7/8), CAMEL (antígeno reconocido por CTL en melanoma), CAP-1 (péptido-1 de antígeno carcinoembrionario), CASP-8 (caspasa-8), CDC27 m (ciclo de división celular 27 mutada), CDK4/m (quinasa dependiente de ciclina 4 mutada),
20 CEA (antígeno carcinoembrionario), CT (cáncer/testículo (antígeno)), Cyp-B (ciclofilina B), DAM (antígeno de diferenciación de melanoma), EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), EGFRvIII (receptor del factor de crecimiento epidérmico, variante III), EGP-2 (glicoproteína epitelial 2), EGP-40 (glucoproteína epitelial 40), Erbb2, 3, 4 (homólogo del oncogén viral de la leucemia eritroblástica 2, -3, 4), ELF2M (factor de elongación 2 mutado),
25 ETV6-AML1 (gen variante 6 de ETS/gen de la leucemia mieloide aguda 1 ETS), FBP (proteína de unión a folato), fAchR (receptor de acetilcolina fetal), G250 (glucoproteína 250), GAGE (antígeno G), GD2 (disialogangliósido 2), GD3 (disialogangliósido 3), GnT-V (N-

acetilglucosaminiltransferasa V), Gp100 (glicoproteína de 100 kD), HAGE (antígeno helicasa), HER-2/neu (receptor epidérmico humano-2/neurológico; también conocido como EGFR2), HLA-A (antígeno leucocitario humano-A) HPV (virus del papiloma humano), HSP70-2M (proteína de choque térmico 70 - 2 mutada), HST-2 (tumor en anillo de sello humano - 2),

5 hTERT o hTRT (transcriptasa inversa de telomerasa humana), iCE (carboxil esterasa intestinal), IL-13R- α 2 (subunidad alfa-2 del receptor de interleucina-13), KIAA0205, KDR (receptor de dominio de inserción de quinasa), cadena ligera κ , LAGE (antígeno L), LDLR/FUT (receptor de lípidos de baja densidad/GDP-L-fucosa: b-D-galactosidasa 2-a-Lfucosiltransferasa), LeY (anticuerpo Lewis-Y), L1CAM (molécula de adhesión celular L1),

10 MAGE (antígeno de melanoma), MAGE -A1 (antígeno asociado a melanoma 1), mesotelina, células murinas infectadas con CMV, MART-1/melan-A (antígeno de melanoma reconocido por células T 1/antígeno de melanoma A), MC1R (receptor de melanocortina 1), miosina/m (miosina mutada), MUC1 (mucina 1), MUM-1, -2, -3 (melanoma ubicuo mutado 1, 2, 3), NA88-A (clon de ADNc de NA del paciente M88), ligandos NKG2D (grupo 2 de destructores naturales,

15 miembro D), NY-BR-1 (antígeno de diferenciación de mama de Nueva York 1), NY-ESO-1 (carcinoma de células escamosas de esófago de Nueva York 1), antígeno oncofetal (h5T4), P15 (proteína 15), p190 minor bcr-abl (proteína de 190KD bcr-abl), Pml/RAR α (leucemia promielocítica/receptor de ácido retinoico α), PRAME (antígeno de melanoma expresado preferentemente), PSA (antígeno prostático específico), PSCA (antígeno de células madre

20 prostáticas), PSMA (antígeno prostático específico de membrana), RAGE (antígeno renal), RU1 o RU2 (renal ubicuo 1 o 2), SAGE (antígeno de sarcoma), SART-1 o SART-3 (antígeno escamoso que rechaza el tumor 1 o 3), SSX1, -2, -3, 4 (sarcoma sinovial X1, -2, -3, -4), TAA (antígeno asociado a tumor), TAG-72 (glicoproteína asociada a tumor 72), TEL/AML1 (translocación Ets-leucemia familiar/leucemia mieloide aguda 1), TPI/m (triosafosfato

25 isomerasa mutada), TRP-1 (proteína relacionada con tirosinasa 1 o gp75), TRP-2 (proteína relacionada con tirosinasa 2), TRP-2/INT2 (TRP-2/intrón 2), VEGF-R2 (receptor del factor de

crecimiento endotelial vascular 2), WT1 (gen del tumor de Wilms), y cualquier combinaciones de estos.

Ejemplos adicionales de antígenos tumorales incluyen 2B4 (CD244, por sus siglas en inglés), 4-1BB, 5T4, antígeno A33, antígeno de adenocarcinoma, adrenoceptor beta 3

(ADRB3, por sus siglas en inglés), proteína de anclaje a quinasa 4 (AKAP-4, por sus siglas en inglés), alfa-fetoproteína (AFP, por sus siglas en inglés), quinasa de linfoma anaplásico (ALK, por sus siglas en inglés), receptor andrógeno, B7H3 (CD276), integrinas β 2, BAFF, célula de linfoma B, antígeno de maduración de células B (BCMA, por sus siglas en inglés), bcr-abl (proteína de fusión de oncogén que consiste en región de

agrupamiento del punto de ruptura (BCR, por sus siglas en inglés) y homólogo 1 del oncogén viral de leucemia murina de Abelson (Abl, por sus siglas en inglés), BhCG, antígeno de células estromales de médula ósea 2 (BST2, por sus siglas en inglés), (BORIS o hermano del regulador de sitios impresos) similar a factor de unión a CCCTC (proteína con dedos de zinc), BST2, antígeno C242, marcador 9-0-acetil-CA19-9, CA-

125, CAEX, calreticulina, anhidrasa carbónica 9 (CAIX, por sus siglas en inglés), C-MET, CCR4, CCR5, CCR8, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD7, CD10, CD16, CD19, CD20, CD22, CD23 (receptor de IgE), CD24, CD25, CD27, CD28, CD30 (TNFRSF8), CD33, CD34, CD38, CD40, CD40L, CD41, CD44, CD44V6, CD49f, CD51, CD52, CD56, CD63, CD70, CD72, CD74, CD79a, CD79b, CD80, CD84, CD96, CD97, CD100, CD123, CD125,

CD133, CD137, CD138, CD150, CD152 (CTLA-4), CD160, CD171, CD179a, CD200, CD221, CD229, CD244, CD272 (BTLA), CD274 (PDL-1, B7H1), CD279 (PD-1), CD352, CD358, miembro f de la familia similar a la molécula CD300 (CD300LF, por sus siglas en inglés), antígeno carcinoembrionario (CEA, por sus siglas en inglés), claudina 6 (CLDN6),

molécula 1 similar a lectina tipo C (CLL-1 o CLECL1, por sus siglas en inglés), miembro A de la familia 12 de dominio de lectina tipo C (CLEC12A), un antígeno de célula infectado por citomegalovirus (CMV), CNT0888, CRTAM (CD355), CS-1 (también denominado como subconjunto 1 de CD2, CRACC, CD319 y 19A24), CTLA-4, ciclina B1, marco de

lectura abierto 61 de cromosoma X (CXORF61, por sus siglas en inglés), citocromo P450 1B 1 (CYP1B1), DNAM-1 (CD226), desmogleína 4, DR3, DR5, neoepítipo de E-cadherina, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés), EGF1R, variante III de receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFRvIII, por sus

5 siglas en inglés), glicoproteína-2 epitelial (EGP-2, por sus siglas en inglés), glicoproteína 40 epitelial (EGP-40, por sus siglas en inglés), módulo similar al EGF que contiene el receptor de la hormona similar a la mucina tipo 2 (EMR2, por sus siglas en inglés), factor de elongación 2 mutado (ELF2M), endosialina, molécula de adhesión celular epitelial (EPCAM, por sus siglas en inglés), receptor 2 de efrina tipo A (EphA2, por sus siglas en

10 inglés), efrina B2, receptor de proteína tirosina quinasa, erb-B2,3,4 (erb-B2,3,4), ERBB, ERBB2 (Her2/neu), ERG (gen de fusión de ETS de proteasa transmembrana, serina 2 (TMPRSS2), ETA, gen 6 de variante de translocación de ETS, ubicado en el cromosoma 12p (ETV6-AML), fragmento Fc del receptor de IgA (FCAR o CD89, por sus siglas en inglés), proteína alfa de activación de fibroblastos (FAP, por sus siglas en inglés), FBP,

15 receptor Fc tipo 5 (FCRL5, por sus siglas en inglés), receptor de acetilcolina fetal (AChR, por sus siglas en inglés), domino B extra de fibronectina, tirosina quinasa 3 similar a fms (FLT3, por sus siglas en inglés), proteína de unión al folato (FBP, por sus siglas en inglés), receptor de folato 1, receptor de folato α , receptor de folato β , antígeno 1 relacionado con Fos, fucosilo, fucosilo GM1; GM2, gangliósido G2 (GD2), gangliósido GD3 (aNeu5Ac(2-

20 8)aNeu5Ac(2-3)bDGalp(I-4)bDGlcp(I-I)Cer),gangliósido o-acetil-GD2 (OAcGD2), GTR (TNFRSF 18), GM1, gangliósido GM3 (aNeu5Ac(2-3)bDGalp(I-4)bDGlcp(I-I)Cer), GP 100, porción hexasacárida de la glicoceramida globoH (GloboH), glicoproteína 75, Glypican-3 (GPC3), glicoproteína 100 (gplOO), GPNMB, receptor 20 acoplado a proteína G (GPR20), receptor acoplado a proteína G clase C grupo 5, miembro D (GPRC5D),

25 receptor celular 1 del virus de la hepatitis A (HAVCR1), receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2), HER2/neu, HER3, HER4, HGF, antígeno asociado al melanoma de alto peso molecular (HMWMAA), virus del papiloma humano

E6 (VPH E6), virus del papiloma humano E7 (VPH E7), proteína de choque térmico 70-2 mutada (mut hsp70-2), receptor cinasa del factor de dispersión humano, transcriptasa inversa de la telomerasa humana (hTERT), HVEM, ICOS, receptor 1 del factor de crecimiento similar a la insulina (receptor IGF-1), IGF-I, IgG1, polipéptido 1 similar a la

5 inmunoglobulina lambda (IGLL1), IL-6, receptor alfa de la interleucina 11 (IL-11Ra), IL-13, subunidad alfa-2 del receptor de la interleucina 13 (IL-13Ra2 o CD213A2), receptor del factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF1-R), integrina $\alpha 5\beta 1$, integrina $\alpha v\beta 3$, carboxilesterasa intestinal, cadena κ -luz, KCS1, receptor del dominio de inserción de la

10 quinasa (KDR), KIR, KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR3DL2, KIR-L, ligandos KG2D, KIT (CD117), KLRG1, LAGE-Ia, LAG3, proteína tirosina cinasa específica de linfocitos (LCK), receptor similar a la inmunoglobulina leucocitaria subfamilia A miembro 2 (LILRA2), legumina, receptor similar a la inmunoglobulina asociada a leucocitos 1 (LAIR1), antígeno Lewis(Y), LeY, LG, molécula de adhesión celular LI (LI-CAM), LIGHT, LMP2, complejo

15 antígeno linfocitario 6, LTBR, locus K 9 (LY6K), Ly-6, antígeno linfocitario 75 (LY75), antígeno testicular del cáncer de melanoma- 1 (MAD-CT-1); antígeno de melanoma

cáncer de testículo 2 (MAD-CT-2), MAGE, antígeno asociado al melanoma 1 (MAGE-A1), antígeno de melanoma MAGE-A3 reconocido por células T 1 (MelanA o MARTI), MelanA/MARTI, mesotelina, MAGE A3, inhibidor de apoptosis de melanoma (ML-IAP), proteoglicano sulfato de condroitina específico del melanoma (MCSCP), MORAb-009,

20 MS4A1, mucina 1 (MUC1), MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC, MUC5b, MUC7, MUC16, CanAg de mucina, receptor tipo II de sustancia inhibidora mulleriana (MIS, por sus siglas en inglés), homólogo derivado de neuroblastoma del oncogén de mielocitomatosis aviar

viral v-myc (MYCN), ácido N-glicolilneurámico, N-acetilglucosaminil-transferasa V (NA17), molécula de adhesión celular neural (NCAM, por sus siglas en inglés), NKG2A,

25 NKG2C, NKG2D, ligandos NKG2E, NKR-P 1A, NPC-1C, NTB-A, antígeno de diferenciación de la glándula mamaria (NY-BR-1), NY-ESO-1, antígeno oncofetal (h5T4), receptor olfatorio 51E2 (OR51E2), OX40, antígeno de células plasmáticas, poli SA,

proteína de unión a la proacrosina sp32 (OY-TES I), p53, p53 mutante, panexina 3 (PANX3), fosfatasa de ácido prostático (PAP, por sus siglas en inglés), proteína de caja pareada Pax-3 (PAX3), proteína de caja pareada Pax-5 (PAX5), antígeno tumoral de carcinoma de próstata 1 (PCTA-1 o galectina 8), PD-1H, receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas alfa (PDGFR-alfa), PDGFR-beta, PDL192, PEN-5, fosfatidilserina, placenta específica 1 (PLAC1), ácido polisiálico, prostasa, células de carcinoma de próstata, prosteína, proteasa serina 21 (testisin o PRSS21), proteínase3 (PR1), antígeno de células madre de próstata (PSCA, por sus siglas en inglés), antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), subunidad del proteasoma (prosoma, macropain), tipo beta, receptor para productos finales de glicación avanzada (RAGE-1), RANKL, Ras mutante, miembro C de la familia de homólogos de Ras (RhoC), RON, receptor 1 huérfano similar al receptor tirosina quinasa (ROR1), ubicuo renal 1 (RU1), ubicuo renal 2 (RU2), puntos de ruptura de la translocación del sarcoma, antígeno de carcinoma de células escamosas reconocido por células T 3 (SART3), SAS, SDC1, SLAMF7, molécula de adhesión de sialil Lewis (sLe), Siglec-3, Siglec-7, Siglec-9, molécula de señalización Sonic Hedgehog (SHH), proteína de esperma 17 (SPA17), antígeno embrionario 4 específico de etapa (SSEA-4), STEAP, antígeno sTn, sarcoma sinovial, punto de ruptura X 2 (SSX2), survivina, glicoproteína asociada al tumor 72 (TAG72), TCR5y, TCRa, TCRB, proteína de marco de lectura alternativo del TCR gamma (TARP, por sus siglas en inglés), telomerasa, precursor de TNF- α TIGIT, marcador endotelial tumoral 1 (TEM1/CD248), marcador endotelial tumoral 7-relacionado (TEM7R, por sus siglas en inglés), tenascina C, TGF beta 2, TGF- β , transglutaminasa 5 (TGS5), receptor de superficie celular de unión a la angiopoyetina 2 (tie 2), TIM1, TIM2, TIM3, Tn Ag, TRAIL-R1, TRAIL-R2, proteína relacionada con tirosinasa 2 (TRP-2), receptor de la hormona estimuladora de la tiroides (TSHR, por sus siglas en inglés), antígeno tumoral CTAA16.88, tirosinasa, ROR1, TAG- 72, uroplaquina 2 (UPK2), VEGF-A, VEGFR-1,

receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2), y vimentina, proteína del tumor de Wilms (WT1), o familia de antígeno X, miembro 1A (XAGE1).

En otras modalidades, la entidad antigénica se asocia con células infectadas por virus (es decir, una entidad antigénica viral). Tales entidades antigénicas también incluyen, pero no

5 se limitan a, un antígeno de virus de Epstein-Barr (EBV, por sus siglas en inglés) (*p. ej.*, EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3, LMP-1, LMP-2), un antígeno del virus de la hepatitis A (*p. ej.*, VP1, VP2, VP3), un antígeno del virus de la hepatitis B (*p. ej.*, HBsAg, HBcAg, HBeAg), un antígeno del virus de la hepatitis C (*p. ej.*, las glicoproteínas de envoltura E1 y E2), un antígeno viral del virus del herpes simple tipo 1, tipo 2 o tipo 8 (HSV1, HSV2 o HSV8) (*p.*
10 *ej.*, glicoproteínas gB, gC, gC, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL. gM, UL20, UL32, US43, UL45, UL49A), un antígeno viral de citomegalovirus (CMV) (*p. ej.*, glicoproteínas gB, gC, gC, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL. gM u otras proteínas de envoltura), un antígeno viral del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (glicoproteínas gp120, gp41 o p24), un antígeno viral de la influenza (*p. ej.*, hemagglutinina (HA) o neuraminidasa (NA)), un antígeno viral del
15 sarampión o las paperas, un antígeno viral del virus del papiloma humano (VPH) (*p. ej.*, L1, L2), un antígeno viral del virus de la parainfluenza, un antígeno viral del virus de la rubéola, un antígeno viral del virus respiratorio sincitial (RSV, por sus siglas en inglés), o un antígeno viral del virus de la varicela-zóster. En tales modalidades, el receptor de superficie celular puede ser cualquier TCR, o cualquier CAR que reconoce cualquiera de los antígenos
20 virales mencionados anteriormente en una célula diana infectada por virus.

En otras modalidades, la entidad antigénica se asocia con células que tienen una disfunción inmunitaria o inflamatoria. Tales entidades antigénicas pueden incluir, pero no se limitan a, proteína básica de mielina (MBP), proteína proteolípida de la mielina (PLP), glicoproteína de oligodendrocitos de la mielina (MOG), antígeno carcinoembrionario (CEA), proinsulina,
25 glutamina descarboxilasa (GAD65, GAD67), proteínas de choque térmico (HSP), o cualquier otro antígeno específico de tejido que esté involucrado o asociado con un proceso autoinmunitario patológico.

En algunas modalidades, el TCR tiene especificidad para una entidad antigénica en células cancerosas. Los ejemplos no limitantes de TCR incluyen un TCR anti-707-AP, TCR anti-AFP, TCR anti-ART-4, TCR anti-BAGE, TCR anti-Bcr-abl, TCR anti-CAMEL, TCR anti-CAP-1, TCR anti-CASP-8, TCR anti-CDC27m, TCR anti-CDK4/m, TCR anti-CEA, TCR anti-CT, TCR anti-Cyp-B, TCR anti-DAM, anti-TCR, TCR anti-EGFRvIII, TCR anti-ELF2M, TCR anti-ETV6-AML1, TCR anti-G250, TCR GAGE, TCR anti-GnT-V, TCR anti-Gp100, TCR anti-HAGE, TCR anti-HER-2/neu, TCR anti-HLA-A, TCR anti-VPH, TCR anti-HSP70-2M, TCR anti-HST-2, TCR anti-hTERT o TCR anti-hTRT, TCR anti-iCE, anti-KIAA0205, anti-LAGE (antígeno L), TCR anti-LDLR/FUT, TCR anti-MAGE, TCR anti-MART-1/Melan-A, TCR anti-MC1R, TCR antimiosina/m, TCR anti-MUC1, TCR anti-MUM-1, -2, -3, TCR anti-NA88-A, TCR anti-NY-ESO-1, TCR anti-P15, TCR anti-p190 minor bcr-abl, TCR anti-Pml/RARa, TCR anti-PRAME, TCR anti-PSA, TCR anti-PSMA, TCR anti-RAGE, TCR anti-RU1 o TCR anti-RU2, TCR anti-SAGE, TCR anti-SART-1 o TCR anti-SART-3, TCR anti-SSX1, -2, -3, 4, TCR anti-TEL/AML1, TCR anti-TPI/m, TCR anti-TRP-1, TCR anti-TRP-2, TCR anti-TRP-2/INT2 o TCR anti-WT1.

Un CAR de la presente descripción puede incluir, además de la molécula de unión al antígeno, una bisagra, un dominio transmembrana y/o un dominio intracelular. En algunas modalidades, el dominio intracelular puede incluir un dominio coestimulador y un dominio de activación.

Una bisagra puede ser un dominio extracelular de un sistema de unión al antígeno colocado entre el motivo de unión y el dominio transmembrana. Una bisagra también se puede denominar un dominio extracelular o un “espaciador”. Una bisagra puede contribuir a la expresión, actividad y/o estabilidad del receptor. Una bisagra también puede proporcionar flexibilidad para acceder al antígeno diana. En algunas modalidades, un dominio bisagra se posiciona entre un motivo de unión y un dominio transmembrana.

En algunas modalidades, la bisagra es, proviene de, o se deriva de (*p. ej.*, comprende todo o un fragmento de) un dominio bisagra similar a la inmunoglobulina. En algunas

modalidades, un dominio bisagra proviene o se deriva de una inmunoglobulina. En algunas modalidades, se selecciona un dominio bisagra de la bisagra de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD, IgE, o IgM, o un fragmento de estas.

En algunas modalidades, la bisagra es, proviene de, o se deriva de (*p. ej.*, comprende la totalidad o un fragmento de) CD2, CD3 delta, CD3 épsilon, CD3 gamma, CD4, CD7, CD8.alfa, CD8.beta, CD11a (ITGAL), CD11b (ITGAM), CD11c (ITGAX), CD11d (ITGAD), CD18 (ITGB2), CD19 (B4), CD27 (TNFRSF7), CD28, CD28T, CD29 (ITGB1), CD30 (TNFRSF8), CD40 (TNFRSF5), CD48 (SLAMF2), CD49a (ITGA1), CD49d (ITGA4), CD49f (ITGA6), CD66a (CEACAM1), CD66b (CEACAM8), CD66c (CEACAM6), CD66d (CEACAM3), CD66e (CEACAM5), CD69 (CLEC2), CD79A (cadena alfa asociada al complejo de receptores de antígeno de células B), CD79B (cadena beta asociada al complejo de receptores de antígeno de células B), CD84 (SLAMF5), CD96 (Tactile), CD100 (SEMA4D), CD103 (ITGAE), CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD158A (KIR2DL1), CD158B1 (KIR2DL2), CD158B2 (KIR2DL3), CD158C (KIR3DP1), CD158D (KIRDL4), CD158F1 (KIR2DL5A), CD158F2 (KIR2DL5B), CD158K (KIR3DL2), CD160 (BY55), CD162 (SELPLG), CD226 (DNAM1), CD229 (SLAMF3), CD244 (SLAMF4), CD247 (CD3-zeta), CD258 (LIGHT), CD268 (BAFFR), CD270 (TNFSF14), CD272 (BTLA), CD276 (B7-H3), CD279 (PD-1), CD314 (NKG2D), CD319 (SLAMF7), CD335 (NK-p46), CD336 (NK-p44), CD337 (NK-p30), CD352 (SLAMF6), CD353 (SLAMF8), CD355 (CRTAM), CD357 (TNFRSF18), coestimulador de células T inducible (ICOS), LFA-1 (CD11a/CD18), NKG2C, DAP-10, ICAM-1, NKp80 (KLRF1), IL-2R beta, IL-2R gamma, IL-7R alfa, LFA-1, SLAMF9, LAT, GADS (GrpL), SLP-76 (LCP2), PAG1/CBP, un ligando CD83, receptor Fc gamma, molécula de clase 1 de MHC, molécula de clase 2 de MHC, una proteína del receptor del TNF, una proteína de inmunoglobulina, un receptor de citocinas, una integrina, receptores de células NK activadoras, o receptor Toll del ligando, o que es un fragmento o combinación de estos.

En algunas modalidades, la bisagra es, es de, o se deriva de (*p. ej.*, comprende todo o un fragmento de) una bisagra de CD8 alfa. En algunas modalidades, la bisagra es, es de, o se deriva de una bisagra de CD28. En algunas modalidades, la bisagra es, es de, o se deriva de un fragmento de una bisagra de CD8 alfa o un fragmento de una bisagra de CD28, en donde el fragmento es algo menos que el todo. En algunas modalidades, un fragmento de una bisagra CD8 alfa o un fragmento de una bisagra CD28 comprende una secuencia de aminoácidos que excluye al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, o al menos 20 aminoácidos en el N-terminal o C-terminal, o ambos, de una bisagra CD8 alfa, o de una bisagra CD28.

Un “dominio transmembrana” se refiere a un dominio que tiene un atributo de estar presente en la membrana cuando está presente en una molécula en una superficie celular o membrana celular (*p. ej.*, que abarca una porción o la totalidad de una membrana celular).

No se requiere la presencia de cada aminoácido en un dominio transmembrana en la membrana. Por ejemplo, en algunas modalidades, un dominio transmembrana se caracteriza porque un estiramiento designado o porción de una proteína está sustancialmente ubicada en la membrana. Las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos se pueden analizar usando una variedad de algoritmos para predecir la localización subcelular de proteínas (*p. ej.* la localización transmembrana). Los programas psort (PSORT.org) y Prosite (prosite.expasy.org) son ejemplos de tales programas.

Un dominio transmembrana se puede derivar de cualquier proteína transmembrana o unida a membrana, tal como una cadena alfa, beta o zeta de un receptor de células T, CD28, CD3 épsilon, CD3 delta, CD3 gamma, CD45, CD4, CD5, CD7, CD8, CD8 alfa, CD8beta, CD9, CD11a, CD11b, CD11c, CD11d, CD16, CD22, CD27, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, TNFSFR25, CD154, 4-1BB/CD137, receptores de células NK activadoras, una proteína inmunoglobulina, B7-H3, BAFFR, BLAME (SLAMF8), BTLA,

CD100 (SEMA4D), CD103, CD160 (BY55), CD18, CD19, CD19a, CD2, CD247, CD276 (B7-H3), CD29, CD30, CD40, CD49a, CD49D, CD49f, CD69, CD84, CD96 (Tactile), CD5, CEACAM1, CRT AM, receptor de citocina, DAP-10, DNAM1 (CD226), receptor gamma Fc, GADS, GITR, HVEM (LIGHTR), IA4, ICAM-1, ICAM-1, Ig alfa (CD79a), IL-2R beta, IL-2R gamma, IL-7R alfa, coestimulador inducible de células T (ICOS), integrinas, ITGA4, ITGA4, ITGA6, ITGAD, ITGAE, ITGAL, ITGAM, ITGAX, ITGB2, ITGB7, ITGB1, KIRDS2, LAT, LFA-1, LFA-1, un ligando que se une a CD83, LIGHT, LIGHT, LTBR, Ly9 (CD229), antígeno 1 asociado a la función de los linfocitos (LFA-1; CD1-1a/CD18), molécula de MHC de clase 1, NKG2C, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, NKp80 (KLRF1), OX-40, PAG/Cbp, muerte programada-1 (PD-1), PSGL1, SELPLG (CD162), moléculas de activación linfocítica de señalización (proteínas SLAM), SLAM (SLAMF1; CD150; IPO-3), SLAMF4 (CD244; 2B4), SLAMF6 (NTB-A; Ly108), SLAMF7, SLP-76, proteínas del receptor del TNF, TNFR2, TNFSF14, un receptor Toll del ligando, TRANCE/RANKL, VLA1, o VLA-6, o un fragmento, truncamiento o una combinación de estos.

El dominio intracelular (o dominio citoplasmático) comprende uno o más dominios de señalización que, tras la unión del antígeno diana al motivo de unión, provocan y/o median una señal intracelular, *p. ej.*, que activa una o más funciones efectoras de células inmunitarias (*p. ej.*, funciones efectoras de células inmunes nativas). En algunas modalidades, los dominios de señalización de un dominio intracelular median la activación de al menos una de las funciones efectoras normales de la célula inmune. La función efectora de una célula T, por ejemplo, puede ser una actividad citolítica o una actividad auxiliar que comprende la secreción de citocinas. En algunas modalidades, los dominios de señalización de un dominio intracelular median en la activación, proliferación, supervivencia y/u otra función de las células T. Un dominio intracelular puede comprender un dominio de señalización que es un dominio de activación. Un dominio intracelular puede comprender un dominio de señalización que es un dominio de señalización coestimulador.

Se conocen dominios de señalización intracelular que pueden transducir una señal tras la unión de un antígeno a una célula inmune. Por ejemplo, se sabe que las secuencias citoplasmáticas de un receptor de células T (TCR) inician la transducción de señales después de la unión de TCR a un antígeno (ver, *p. ej.*, Brownlie et al., Nature Rev. Immunol. 13:257-269 (2013)).

En algunas modalidades, los dominios de señalización adecuados incluyen, sin limitarse a, los de 4-1BB/CD137, receptores de células NK activadoras, una proteína de inmunoglobulina, B7-H3, BAFFR, BAME (SLAMF8), BTLA, CD100 (SEMA4D), CD103, CD160 (BY55), CD18, CD19, CD19a, CD2, CD247, CD27, CD276 (B7-H3), CD28, CD29, CD3 delta, CD3 épsilon, CD3 gamma, CD30, CD4, CD40, CD49a, CD49D, CD49f, CD69, CD7, CD84, CD8 alfa, CD8 beta, CD96 (táctil), CD11a, CD11b, CD11c, CD11d, CD5, CEACAM1, CRT AM, receptor de citocina, DAP-10, DNAM1 (CD226), receptor Fc gamma, GADS, GITR, HVEM (LIGHTR), IA4, ICAM-1, ICAM-1, Ig alfa (CD79a), IL-2R beta, IL-2R gamma, IL-7R alfa, coestimulador de células T inducible (ICOS), integrinas, ITGA4, ITGA4, ITGA6, ITGAD, ITGAE, ITGAL, ITGAM, ITGAX, ITGB2, ITGB7, ITGB1, KIRDS2, LAT, LFA-1, LFA-1, ligando que se une con CD83, LIGHT, LIGHT, LTBR, Ly9 (CD229), Ly108), antígeno asociado a la función linfocitaria 1 (LFA-1; CD1-1a/CD18), molécula de MHC de clase 1, NKG2C, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, NKp80 (KLRF1), OX-40, PAG/Cbp, muerte programada-1 (PD-1), PSGL1, SELPLG (CD162), moléculas de activación linfocítica de señalización (proteínas SLAM), SLAM (SLAMF1; CD150; IPO-3), SLAMF4 (CD244; 2B4), SLAMF6 (NTB-A, SLAMF7, SLP-76, proteínas receptoras de TNF, TNFR2, TNFSF14, un receptor de ligando Toll, TRANCE/RANKL, VLA1 o VLA-6, o un fragmento, truncamiento o una combinación de estos.

Un CAR también puede incluir un dominio de señalización coestimulador, *p. ej.*, para aumentar la potencia de señalización. Ver las patentes de los EE. UU. núms. 7.741.465, y 6.319.494, así como Krause et al. y Finney et al. (*supra*), Song et al., Blood 119:696-706 (2012); Kalos et al., Sci Transl. Med. 3:95 (2011); Porter et al., N. Engl. J. Med.

365:725-33 (2011), y Gross et al., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 56:59-83 (2016)). Las señales generadas a través de un TCR solo pueden ser insuficientes para la activación completa de una célula T y una señal secundaria o coestimuladora puede aumentar la activación. Por lo tanto, en algunas modalidades, un dominio de señalización comprende además uno o más dominios de señalización adicionales (p. ej., dominios de señalización coestimuladores) que activan una o más funciones efectoras de células inmunitarias (p. ej., una función efectora de célula inmunitaria nativa descrita en la presente). En algunas modalidades, puede usarse una porción de tales dominios de señalización coestimuladores, siempre que la porción transduzca la señal de la función efectora. En algunas modalidades, un dominio citoplásmico descrito en la presente comprende una o más secuencias citoplasmáticas de un correceptor de células T (o fragmento de este). Los ejemplos no limitantes de tales correceptores de células T comprenden CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno -1 asociado con la función de linfocitos (LFA-1), MYD88, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, y un ligando que se une con CD83. Una proteína coestimuladora ilustrativa tiene la secuencia de aminoácidos de una proteína coestimuladora que se encuentra naturalmente en las células T, cuya secuencia de aminoácidos nativa completa de cuya proteína coestimuladora se describe en la secuencia de referencia de NCBI: NP 0.1. En ciertos casos, un CAR incluye un dominio coestimulador 4-1BB. En ciertos casos, un CAR incluye un dominio coestimulador CD28. En ciertos casos, un CAR incluye un dominio coestimulador DAP-10.

En algunas modalidades, el dominio de señalización coestimuladora es un dominio de señalización de CD28. Como se muestra en los ejemplos experimentales, las moléculas CAR con un dominio de señalización coestimulador CD28 se pueden beneficiar particularmente del proceso de elaboración acelerado recientemente desarrollado. En algunas modalidades, el CAR se codifica por una molécula de ácido nucleico incrustada en un vector viral. En algunas

modalidades, el CAR se codifica por una molécula de ácido nucleico incrustada en un vector lentiviral.

En algunas modalidades, el CAR incluye además un ITAM. Los ejemplos de ITAM que contienen secuencias de señalización citoplasmáticas primarias que son de uso particular en la descripción incluyen los derivados de TCRzeta, FcRgamma, FcRbeta, CD3gamma, CD3delta, CD3epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. En algunas modalidades, el ITAM incluye CD3 zeta.

En algunas modalidades, la molécula CAR puede ser cualquier molécula CAR anti-CD19. En un aspecto, el CAR anti-CD19 incluye un dominio scFv extracelular, una porción intracelular y/o transmembrana de una molécula CD28, una porción extracelular opcional de la molécula CD28 y un dominio CD3zeta intracelular como se describe en WO2015120096 o WO2016191755, cada uno de los cuales se incorpora en la presente descripción en su totalidad.

En ciertas modalidades, el CAR anti-CD19 también puede incluir dominios adicionales, tales como una región extracelular y/o transmembrana de CD8, un dominio Fc de inmunoglobulina extracelular (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) o uno o más dominios de señalización adicionales, tales como 41 BB, OX40, CD2 CD16, CD27, CD30 CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, receptor IL-2, receptor Fc gamma o cualquier otro dominio coestimulador con motivos de activación de inmunorreceptores basados en tirosina.

En ciertas modalidades, el receptor de la superficie celular es un CAR anti-CD19, tal como CAR FMC63-28Z o CAR FMC63-CD828BBZ como se establece en Kochenderfer et al., J Immunother. 2009 September; 32(7): 689-702, "Construction and Preclinical Evaluation of an Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor", cuya materia se incorpora en la presente descripción como referencia para proporcionar los métodos de construcción de los vectores usados para producir células T que expresan CAR FMC63-28Z o CAR FMC63-CD828BBZ.

En algunas modalidades, la célula T que incluye una molécula CAR es Yescarta® (axicabtagene ciloleucel). En algunas modalidades, la célula T que incluye una molécula CAR es Tecartus® (brexucabtagene autoleucel).

En algunas modalidades, los linfocitos diseñados por ingeniería comprenden un sistema de unión al antígeno de doble diana. Los sistemas de unión al antígeno de doble diana pueden comprender CAR o TCR biespecíficos y/o CAR o TCR bistrónicos. Los CAR biespecíficos y bistrónicos pueden comprender dos motivos de unión (en una sola molécula CAR o en dos moléculas CAR, respectivamente). En algunas modalidades, el vector de la presente descripción codifica CAR bistrónicos y/o biespecíficos (*p. ej.*, CAR bistrónicos y/o biespecíficos que se unen a CD20 y CD19).

En algunas modalidades, se proporciona una composición farmacéutica que incluye una población de linfocitos diseñados por ingeniería producida por los métodos descritos en la presente. En ciertas modalidades, la composición farmacéutica también puede incluir un portador farmacéuticamente aceptable. Un portador farmacéuticamente aceptable puede ser un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable que participa en el transporte de células de interés desde un tejido, órgano o porción del cuerpo a otro tejido, órgano o porción del cuerpo. Por ejemplo, el portador puede ser un agente de relleno, diluyente, excipiente, solvente o material encapsulante líquido o sólido, o alguna combinación de estos. Cada componente del portador debe ser “farmacéuticamente aceptable” en el sentido de que debe ser compatible con los demás ingredientes de la formulación. También debe ser apto para el contacto con cualquier tejido, órgano o porción del cuerpo que pueda encontrar, lo que significa que no debe conllevar riesgo de toxicidad, irritación, respuesta alérgica, inmunogenicidad o cualquier otra complicación que supere excesivamente sus beneficios terapéuticos.

Tratamientos y usos, y almacenamiento opcional

Los linfocitos preparados mediante los métodos instantáneos, o las poblaciones de linfocitos como se describen en la presente, se pueden usar para tratar diversas enfermedades y afecciones.

- 5 En algunas modalidades, si los linfocitos no se usan de inmediato, se pueden crioconservar de tal manera que puedan ser usados en una fecha posterior. Tal un método puede incluir una etapa de lavado y concentración de la población de linfocitos diseñados por ingeniería con una solución diluyente. En algunos aspectos, la solución diluyente es una solución salina normal, solución salina al 0,9 %, solución PlasmaLyte A (PL), solución salina de dextrosa al
- 10 5 %/NaCl al 0,45 % (D5), albúmina sérica humana (HSA), o una combinación de estos. En algunos aspectos, la HSA se puede añadir a las células lavadas y concentradas para mejorar la viabilidad celular y la recuperación celular después de la descongelación. En otro aspecto, la solución de lavado es solución salina normal y las células lavadas y concentradas se suplementan con HSA (5 %). El método también puede incluir una etapa de generación de
- 15 una mezcla de criopreservación, en donde la mezcla de criopreservación incluye la población diluida de células en la solución de diluyente y una solución criopreservante adecuada. En algunos aspectos, la solución criopreservante puede ser cualquier solución criopreservante adecuada que incluye, pero no se limita a, CryoStor10 (BioLife solution), mezclada con la solución de diluyente de linfocitos diseñados por ingeniería a una relación de 1:1 o 2:1.
- 20 En ciertas modalidades, se puede añadir HSA para proporcionar una concentración final de aproximadamente 1,0–10 % de HSA en la mezcla crioconservada. En ciertas modalidades, se puede añadir HSA para proporcionar una concentración final de aproximadamente 1,0 %, aproximadamente 2,0 %, aproximadamente 3,0 %, aproximadamente 4,0 %, aproximadamente 5,0 %, aproximadamente 6,0 %, aproximadamente 7,0 %, aproximadamente 8,0 %, aproximadamente 9,0 %, o
- 25 aproximadamente 10,0 % de HSA en la mezcla criopreservada. En ciertas modalidades, se puede añadir HSA para proporcionar una concentración final de aproximadamente

1-3 % de HSA, aproximadamente 1-4 % de HSA, aproximadamente 1-5 % de HSA, aproximadamente 1-7 % de HSA, aproximadamente 2-4 % de HSA, aproximadamente 2-5 % de HSA, aproximadamente 2-6 % de HSA, o aproximadamente 2-7 % de HSA en la mezcla crioconservada. En ciertas modalidades, se puede añadir HSA para proporcionar una concentración final de aproximadamente 2,5 % de HSA en la mezcla crioconservada. Por ejemplo, en ciertas modalidades, la criopreservación de una población de células T diseñadas por ingeniería puede comprender el lavado de células con una solución salina normal al 0,9 %, la adición de HSA a una concentración final de 5 % a las células lavadas, y la dilución de las células 1:1 con CryoStor™ CS10 (para una concentración final de HSA al 2,5 % en la mezcla final de criopreservación). En algunas modalidades, el método también incluye una etapa de congelación de la mezcla de criopreservación. En un aspecto, la mezcla de criopreservación se congela en un congelador de velocidad controlada usando un ciclo de congelación definido a una concentración celular de entre aproximadamente $1e6$ a aproximadamente $1.5e7$ células por ml de la mezcla de criopreservación. El método también puede incluir una etapa de almacenamiento de la mezcla de criopreservación en nitrógeno líquido en fase de vapor. También se proporcionan métodos y usos para tratar una enfermedad o afección patológica en un sujeto que padece la enfermedad o afección patológica. En algunas modalidades, el método implica administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva o una dosis terapéuticamente efectiva de los linfocitos diseñados por ingeniería. Las afecciones patógenas que se pueden tratar con células T diseñadas por ingeniería que se producen mediante los métodos descritos en la presente incluyen, pero no se limitan a, cáncer, infección viral, inflamación aguda o crónica, enfermedad autoinmune o cualquier otra disfunción inmunitaria.

Como se hace referencia en la presente descripción, un “cáncer” puede ser cualquier cáncer que se asocia con un antígeno de superficie o marcador de cáncer, que incluye, pero no se limita a, leucemia linfoblástica aguda (ALL, por sus siglas en inglés), leucemia mieloide aguda

(AML, por sus siglas en inglés), carcinoma quístico adenoide, carcinoma adrenocortical, cánceres relacionados con el SIDA, cáncer anal, cáncer de apéndice, astrocitomas, tumor teratoideo/rabdoideo atípico, sistema nervioso central, leucemia de células B, linfoma u otras malignidades de células B, carcinoma de células basales, cáncer de las vías biliares, cáncer

5 de vejiga, cáncer de huesos, osteosarcoma e histiocitoma fibroso maligno, glioma del tronco encefálico, tumores cerebrales, cáncer de mama, tumores bronquiales, linfoma de Burkitt, tumores carcinoides, cánceres del sistema nervioso central, cáncer de cuello uterino, cordoma, leucemia linfocítica crónica (CLL, por sus siglas en inglés), leucemia mielógena crónica (CML, por sus siglas en inglés), trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de colon, cáncer

10 colorrectal, craneofaringioma, linfoma de células T cutáneo, tumores embrionarios, sistema nervioso central, cáncer de endometrio, ependimoblastoma, ependimoma, cáncer de esófago, estesioneuroblastoma, familia de tumores del sarcoma de Ewing tumor extracraneal de células germinales, tumor extragonadal de células germinales cáncer de las vías biliares extrahepáticas, cáncer de ojo histiocitoma fibroso maligno de hueso y osteosarcoma, cáncer

15 de vesícula biliar, cáncer gástrico (de estómago), tumor carcinoide gastrointestinal, tumores del estroma gastrointestinal (GIST, por sus siglas en inglés), sarcoma de tejidos blandos, tumor de células germinales, tumor trofoblástico gestacional, glioma, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de corazón, cáncer hepatocelular (hígado), histiocitosis, linfoma de Hodgkin, cáncer de hipofaringe, melanoma intraocular, tumores de células de los islotes

20 (páncreas endocrino), sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, histiocitosis de células de Langerhans, cáncer de laringe, leucemia, cáncer de labio y cavidad oral, cáncer de hígado (primario), carcinoma lobulillar in situ (LCIS, por sus siglas en inglés), cáncer de pulmón, linfoma, macroglobulinemia, cáncer de mama masculino, histiocitoma fibroso maligno de hueso y osteosarcoma, meduloblastoma, meduloepitelioma, melanoma, carcinoma de células de

25 Merkel, mesotelioma, cáncer de cuello escamoso metastásico con carcinoma de línea media primario oculto que involucra el gen NUT, cáncer de boca, síndromes de neoplasia endocrina múltiple, mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas, micosis fungoide, síndromes

mielodisplásicos, neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas, leucemia mielógena crónica (CML), leucemia mieloide aguda (AML), mieloma múltiple trastornos mieloproliferativos, cáncer de cavidad nasal y senos paranasales, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, linfoma no Hodgkin, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer oral, cáncer de la cavidad oral, 5 cáncer orofaríngeo, osteosarcoma e histiocitoma fibroso maligno de hueso, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, papilomatosis, paraganglioma, cáncer de seno paranasal y cavidad nasal, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, cáncer de faringe, feocromocitoma, tumores del parénquima pineal de diferenciación intermedia, pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, tumor de la pituitaria, neoplasia de células plasmáticas/mieloma 10 múltiple, blastoma pleuropulmonar, embarazo y cáncer de mama, linfoma primario del sistema nervioso central (CNS, por sus siglas en inglés), cáncer de próstata, cáncer de recto, cáncer de células renales (riñón), cáncer de células de transición de pelvis renal y de uréter, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de glándulas salivales, sarcoma, síndrome de Sézary, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de intestino delgado, sarcoma de 15 tejidos blandos, carcinoma de células escamosas, cáncer de cuello escamoso, cáncer de estómago (gástrico), tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, linfoma de células T cutáneo, cáncer de testículo, cáncer de garganta, timoma y carcinoma tímico, cáncer de tiroides, cáncer de células de transición de la pelvis renal y uréter, tumor trofoblástico, cáncer de uréter y pelvis renal, cáncer de uretra, cáncer de útero, sarcoma de útero, cáncer de vagina, 20 cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenström, tumor de Wilms.

En algunos aspectos, el cáncer es una neoplasia maligna de células B. Los ejemplos de las malignidades de células B incluyen, pero no se limitan a, linfomas no Hodgkin (NHL, por sus siglas en inglés), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL, por sus siglas en inglés), linfoma linfocítico pequeño (SLL/CLL, por sus siglas en inglés), linfoma de células 25 del manto (MCL, por sus siglas en inglés), linfoma folicular (FL, por sus siglas en inglés), linfoma de zona marginal (MZL, por sus siglas en inglés), extranodal (linfoma MALT), nodal (linfoma monocitoide de células B), esplénico, linfoma difuso de células grandes,

leucemia/linfoma linfocítico crónico de células B, linfoma de Burkitt, linfoma linfoblástico. Como se hace referencia en la presente descripción, una “infección viral” puede ser una infección causada por cualquier virus que cause una enfermedad o condición patológica en el huésped. Los ejemplos de infecciones virales que se pueden tratar con células T

5 diseñadas por ingeniería que se producen mediante los métodos descritos en la presente incluyen, pero no se limitan a, una infección viral causada por un virus de Epstein-Barr (EBV); una infección viral causada por un virus de la hepatitis A, un virus de la hepatitis B o un virus de la hepatitis C; una infección viral causada por un virus del herpes simple tipo 1, un virus del herpes simple tipo 2 o un virus del herpes simple tipo 8, una infección viral

10 causada por un citomegalovirus (CMV), una infección viral causada por un virus de inmunodeficiencia humana (VIH), una infección viral causada por un virus de la influenza, una infección viral causada por un virus del sarampión o de las paperas, una infección viral causada por un virus del papiloma humano (VPH), una infección viral causada por un virus de la parainfluenza, una infección viral causada por un virus de la rubéola, una infección

15 viral causada por un virus respiratorio sincitial (VSR, por sus siglas en inglés) o una infección viral causada por un virus varicela-zoster. En algunos aspectos, una infección viral puede conducir o resultar en el desarrollo de cáncer en un sujeto con la infección viral (p. ej., la infección por VPH puede causar o asociarse con el desarrollo de varios cánceres, que incluyen los cánceres de cuello uterino, de vulva, de vagina, de pene, de orofaringe y

20 la infección por VIH pueden causar el desarrollo del sarcoma de Kaposi). Los ejemplos de enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades autoinmunitarias o cualquier otra disfunción inmunitaria que se puedan tratar con células T diseñadas por ingeniería producidas mediante los métodos descritos en la presente incluyen, pero no se limitan a, esclerosis múltiple, lupus y psoriasis.

25 Ejemplos adicionales de enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades autoinmunitarias o cualquier otra disfunción inmunitaria que se puedan tratar con células T diseñadas por ingeniería producidas mediante los métodos descritos en la presente

incluyen artritis reumatoide, alergias, asma, enfermedad de Crohn, IBD, IBS, fibromialgia, mastocitosis y enfermedad celíaca.

El término “tratar”, “que trata” o “tratamiento” como se usa en la presente descripción con respecto a una afección o enfermedad se puede referir a prevenir una afección o enfermedad, retardar la aparición o tasa de desarrollo de la afección o enfermedad, reducir el riesgo de desarrollar la afección o enfermedad, prevenir o retrasar el desarrollo de los síntomas asociados con la afección o enfermedad, reducir o finalizar los síntomas asociados con la afección o enfermedad, generar una regresión completa o parcial de la afección o enfermedad, o alguna combinación de estos.

Una “cantidad terapéuticamente efectiva” o una “dosis terapéuticamente efectiva” es una cantidad de linfocitos diseñados por ingeniería que producen un efecto terapéutico deseado en un sujeto, tal como prevenir o tratar una afección diana o aliviar los síntomas asociados con la afección al matar células diana. Los resultados más efectivos en términos de eficacia del tratamiento en un sujeto determinado variarán dependiendo de una variedad de factores, que incluyen, pero no se limitan a, las características de los linfocitos diseñados por ingeniería (incluidas la longevidad, la actividad, la farmacocinética, la farmacodinamia y la biodisponibilidad), la afección fisiológica del sujeto (que incluye edad, sexo, tipo y etapa de la enfermedad, condición física general, capacidad de respuesta a una dosis determinada y tipo de medicamento), la naturaleza de cualquier portador o portadores farmacéuticamente aceptables en cualquier composición usada, y la vía de administración.

Una dosis terapéuticamente efectiva de linfocitos diseñados por ingeniería también depende del receptor de la superficie celular que expresan los linfocitos (*p. ej.*, la afinidad y densidad de los receptores de la superficie celular expresados en la célula), el tipo de célula diana, la naturaleza de la enfermedad o condición patológica que se está tratando, o una combinación de ambas.

Como se muestra en los ejemplos, los linfocitos diseñados por ingeniería preparados mediante el presente proceso tienen una eficacia *in vivo* muy aumentada y, por lo tanto, se requiere una dosis mucho menor, en comparación con la tecnología convencional.

Por lo tanto, en algunos aspectos, una dosis terapéuticamente efectiva de linfocitos

5 diseñados por ingeniería es menor que aproximadamente 2 millones de linfocitos diseñados por ingeniería por kilogramo de peso corporal del sujeto que necesita tratamiento (células/kg). Por lo tanto, en algunos aspectos, una dosis terapéuticamente efectiva de linfocitos diseñados por ingeniería es de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 2.500.000 linfocitos diseñados por ingeniería/kg. En ciertas

10 modalidades, una dosis terapéuticamente efectiva de linfocitos diseñados por ingeniería es de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 1.500.000 linfocitos diseñados por ingeniería/kg. En ciertas modalidades, la dosis terapéuticamente efectiva es aproximadamente 20.000 a aproximadamente 1.200.000 linfocitos diseñados por ingeniería/kg. En ciertas modalidades, la dosis terapéuticamente efectiva es

15 aproximadamente 20.000 a aproximadamente 1.000.000 linfocitos diseñados por ingeniería/kg. En ciertas modalidades, la dosis terapéuticamente efectiva es aproximadamente 20.000 a aproximadamente 500.000 linfocitos diseñados por ingeniería/kg. En ciertas modalidades, la dosis terapéuticamente efectiva es aproximadamente 20.000 a aproximadamente 400.000 linfocitos diseñados por

20 ingeniería/kg. En ciertas modalidades, la dosis terapéuticamente efectiva es aproximadamente 40.000 a aproximadamente 400.000 linfocitos diseñados por ingeniería/kg. En ciertas modalidades, la dosis terapéuticamente efectiva es aproximadamente 50.000 a aproximadamente 200.000 linfocitos diseñados por ingeniería/kg. En ciertas modalidades, la dosis terapéuticamente efectiva es

25 aproximadamente 50.000 a aproximadamente 100.000 linfocitos diseñados por ingeniería/kg.

En algunos aspectos, una dosis terapéuticamente efectiva de linfocitos diseñados por ingeniería es de aproximadamente 1.600.000 a aproximadamente 2.500.000 linfocitos diseñados por ingeniería por kilogramo de peso corporal del sujeto que necesita tratamiento (células/kg). En algunas modalidades, la dosis terapéuticamente efectiva de linfocitos diseñados por ingeniería es de aproximadamente 2.000.000 a aproximadamente 2.400.000 linfocitos diseñados por ingeniería por kilogramo de peso corporal del sujeto que necesita tratamiento (células/kg).

En algunas modalidades, las células T administradas son Yescarta® (axicabtagene ciloleucel). En algunas modalidades, las células T administradas son Tecartus® (brexucabtagene autoleucel).

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar varias modalidades de la invención. Como tal, las modalidades específicas descritas no se deben interpretar como limitaciones del alcance de la invención. Por ejemplo, aunque los ejemplos más abajo se dirigen a células T transducidas con un receptor de antígeno quimérico (CAR) anti-CD19, un experto en la técnica entenderá que los métodos descritos en la presente se pueden aplicar a células inmunitarias transducidas con cualquier CAR. Resultará evidente para un experto en la técnica que se pueden realizar varios cambios y modificaciones equivalentes sin apartarse del alcance de la invención y se entiende que tales modalidades equivalentes se deben incluir en la presente descripción. Además, todas las referencias citadas en la descripción se incorporan en la presente descripción como referencia en su totalidad, como si se expusieran completamente en la presente descripción.

Ejemplo 1: Proceso de elaboración de linfocitos de siete días

Este ejemplo describe un proceso de preparación de linfocitos que se transducen con un vector polinucleotídico, tal como un vector viral, que codifica una proteína terapéutica. Los linfocitos preparados pueden ser útiles para tratar diversas enfermedades tales como el cáncer, especialmente cuando la proteína terapéutica es un receptor de antígeno

quimérico (CAR) o un receptor de células T (TCR) diseñado para atacar una célula cancerosa.

Tal como se usan en todo momento, los términos “proceso de 7 días” y “proceso de elaboración de linfocitos de 7 días” se usan indistintamente y se refieren a un proceso de elaboración de células CAR que dura aproximadamente 7 días después de las etapas iniciales de enriquecimiento y activación. El proceso de 7 días tiene una duración de al menos 8 días desde las etapas iniciales de enriquecimiento y activación hasta una etapa de recolección, y puede durar entre 8 a 11 días en total si se incluyen las etapas de enriquecimiento y activación.

5 *Colección de aféresis.* Se recolectaron glóbulos blancos (leucoféresis) usando un equipo de aféresis estándar, tal como Cobe® Spectra, Spectra Optia®, Fenwal™ Amicus® o equivalente. El proceso de leucoféresis típicamente rindió aproximadamente 200-400 ml de un producto de aféresis de los pacientes. El producto de aféresis se puede someter al proceso de elaboración en el sitio, opcionalmente, enviar a 1-10 °C a una instalación para someterse al proceso de elaboración en una ubicación diferente. Se pueden realizar etapas adicionales del proceso en un conjunto de procesos de cultivo celular ISO 7 (o en un entorno similar de sala limpia).

Reducción de volumen. Donde corresponda, se realizó una etapa de reducción de volumen usando un instrumento de procesamiento celular tal como el instrumento de laboratorio Sepax® 2 (Biosafe SA; Houston, TX) o equivalente, y se realizó usando un kit de tubos asépticos estándar. Dada la variabilidad en el número de células y el volumen de material fuente entrante de cada sujeto (aproximadamente 200-400 ml), la etapa de reducción de volumen se diseña para estandarizar el volumen de células a aproximadamente 120 ml. En el caso de que el volumen de aféresis sea menor que 120 ml, no es necesario realizar la etapa de reducción de volumen y las células se llevan directamente a la etapa de enriquecimiento de linfocitos. La etapa de reducción de volumen se diseña para estandarizar el volumen de células recibidas de cada sujeto, retener células

mononucleares, lograr un rendimiento celular constante y una alta viabilidad celular y mantener un sistema cerrado para minimizar el riesgo de contaminación.

Enriquecimiento de linfocitos. Después de la etapa de reducción de volumen, las células se sometieron a una separación basada en Ficoll en un instrumento de procesamiento celular, tal como Sepax® 2 o equivalente, usando el protocolo de separación desarrollado y recomendado por el fabricante del instrumento (Programa NeatCell) y usando un kit de tubos asépticos estándar. La etapa de enriquecimiento de linfocitos reduce las impurezas relacionadas con el producto, tales como RBC y granulocitos, enriquece y concentra las células mononucleares, lava y reduce los residuos relacionados con el proceso, tal como Ficoll, y formula las células en medios de crecimiento en preparación para la activación celular, además de lograr un rendimiento celular constante y una alta viabilidad celular. El sistema cerrado minimiza la contaminación ambiental.

El proceso se puede llevar a cabo en un área ISO 7 a temperatura ambiente y todas las conexiones se pueden realizar usando un soldador de tubos estéril o en una campana de flujo laminar ISO 5.

Activación de linfocitos. La etapa de activación de linfocitos se puede realizar con células recién procesadas del enriquecimiento de linfocitos o con células previamente criopreservadas. En el caso de que se usen células criopreservadas, las células se pueden descongelar usando protocolos desarrollados antes de su uso.

La etapa de activación de linfocitos activa selectivamente los linfocitos para que se vuelvan receptivos a la transducción de vectores retrovirales, reduce la población viable de todos los demás tipos de células, logra un rendimiento celular constante y una alta viabilidad de los linfocitos, y mantiene un sistema cerrado para minimizar el riesgo de contaminación. La activación de linfocitos se puede lograr con agentes estimulantes de los linfocitos, tales como los anticuerpos anti-CD3 e IL-2.

Lavado 1. Después de la etapa de activación de linfocitos, las células se lavaron usando un equipo de procesamiento celular, tal como Sepax® 2 o equivalente, con medios de

cultivo nuevos en un kit aséptico estándar usando protocolos desarrollados por el fabricante. Opcionalmente, las células se concentraron hasta un volumen final de aproximadamente 100 ml en preparación para la transducción del vector retroviral. La etapa de Lavado 1 reduce los residuos relacionados con el proceso, tales como el anticuerpo anti-CD3, los medios de crecimiento gastados y los desechos celulares; logra un rendimiento celular constante y una alta viabilidad de las células T, mantiene un sistema cerrado para minimizar el riesgo de contaminación; y concentra y administra una cantidad suficiente de células T viables en un pequeño volumen apropiado para el inicio de la transducción.

Transducción. Las células activadas de la etapa de Lavado 1 en medio de crecimiento celular fresco se transfirieron a una bolsa de cultivo celular (Origen Biomedical PL240 o comparable) que se preparó previamente recubriendo primero las bolsas con fibronectina recombinante o fragmentos de esta, tales como RetroNectin® (Takara Bio, Japón), y posteriormente se incubaron con un vector retroviral de acuerdo con procedimientos definidos antes de la introducción de las células activadas. El recubrimiento con RetroNectin® (10 µg/ml) se realizó a una temperatura de 2-8 °C durante 20 ± 4 h, se lavó con regulador diluido y posteriormente se incubó con vector retroviral descongelado durante aproximadamente 180 - 210 min a 37 ± 1 °C y $5 \pm 0,5$ % de CO₂. Después de la adición de células a la bolsa, la transducción se realizó durante 20 ± 4 horas a 37 ± 1 °C y $5 \pm 0,5$ % de CO₂. La etapa de transducción retroviral cultiva las células T activadas en la presencia del vector retroviral en condiciones controladas para permitir que se lleve a cabo una transducción eficiente, logra un rendimiento celular consistente y una alta viabilidad celular, y mantiene un sistema cerrado para minimizar el riesgo de contaminación.

Lavado 2. Después de la etapa de transducción retroviral, las células se lavaron con medios de crecimiento nuevos usando un equipo de procesamiento celular, tales como Sepax® 2 o equivalente, en un kit aséptico estándar usando protocolos desarrollados por el fabricante, y las células se concentraron hasta un volumen final de aproximadamente 100 ml en

preparación para la etapa de expansión. La etapa de Lavado 2 se diseñó para reducir los residuos relacionados con el proceso, tales como partículas de vectores retrovirales, residuos del proceso de producción de vectores, medios de crecimiento gastados y desechos celulares, para lograr un rendimiento celular consistente y una alta viabilidad celular; mantener un sistema cerrado para minimizar el riesgo de contaminación; e intercambiar medios de crecimiento gastados por medios nuevos con un número diana de células en un volumen específico apropiado para el inicio de la etapa de expansión.

Expansión de linfocitos. Las células de la etapa de Lavado 2 se transfirieron asépticamente a una bolsa de cultivo (Origen Biomedical PL325 o equivalente) y se diluyeron con medio de crecimiento celular fresco y se cultivaron durante aproximadamente 72 h a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ y $5 \pm 0,5\%$ de CO_2 . La densidad celular se midió diariamente a partir del día 5. Debido a que los tiempos de duplicación de las células T pueden variar ligeramente de un sujeto a otro, puede ser necesario un tiempo de crecimiento adicional más allá de 72 horas (es decir, 3 a 6 días) en el caso de que el número total de células sea insuficiente para administrar una dosis diana de células T CAR positivas/kg de peso del sujeto. La etapa de expansión de linfocitos se diseña para cultivar las células en condiciones controladas a fin de producir una cantidad suficiente de células transducidas para administrar una dosis efectiva, mantener un sistema cerrado para minimizar el riesgo de contaminación y lograr un rendimiento celular constante y una alta viabilidad celular. Una de tales dosis eficaces o dosis diana incluye 2×10^6 células T FMC63-28Z CAR positivas o FMC63-CD828BBZ CAR positivas/kg ($\pm 20\%$) de peso del sujeto que se produjeron mediante transducción con el vector retroviral MSGV-FMC63-28Z o el vector retroviral MSGV-FMC63-CD828BBZ, respectivamente, los cuales se describen en detalle en Kochenderfer et al., *J Immunother.* 2009 September; 32(7): 689–702.

Lavado 3 y Concentrado. Después de la etapa de expansión de los linfocitos, las células se lavaron con solución salina al 0,9 % usando un instrumento de procesamiento celular, tal como Sepax® 2 o equivalente, en un kit aséptico estándar usando protocolos

desarrollados por el fabricante, y las células se concentraron hasta un volumen final. de aproximadamente 35 ml en preparación para la formulación y criopreservación. La etapa de lavado 3 se diseña para reducir los residuos relacionados con el proceso, tales como los residuos del proceso de producción de retrovirales, los medios de crecimiento gastados y los desechos celulares; lograr un rendimiento celular constante y una alta viabilidad celular; y mantener un sistema cerrado para minimizar el riesgo de contaminación.

Una vez que las células se concentraron y lavaron con solución salina al 0,9 %, se puede formular una dosis celular adecuada para la preparación del producto criopreservado final.

- 10 Las modalidades descritas en la presente proporcionan la producción eficiente de una terapia de linfocitos diseñados por ingeniería en un plazo de 7 días.

Ejemplo 2: Proceso de elaboración de linfocitos de cinco días

- 15 Este ejemplo desarrolló un proceso acelerado basado en el proceso de 7 días como se describe en el Ejemplo 1.

- Tal como se usan en todo momento, los términos “proceso de 5 días” y “proceso de elaboración de linfocitos de 5 días” se usan indistintamente y se refieren a un proceso de elaboración de células CAR que dura aproximadamente 5 días después de las etapas iniciales de enriquecimiento y activación. El proceso de 5 días tiene una duración de 6 días desde las etapas iniciales de enriquecimiento y activación hasta una etapa de recolección, y puede durar entre 6 y 9 días en total si se incluyen las etapas de enriquecimiento y activación.

- 25 Durante el proceso de 7 días, los linfocitos se enriquecen y activan el día 0; la bolsa de transducción se recubre con fibronectina recombinante el día 1; la transducción viral se realiza el día 2; los linfocitos transducidos se lavan y después se expanden los días 3 y 4; la expansión continúa con los medios cambiados cada día en los días 5 y 6; y los productos celulares finales se recolectan el día 7. De aproximadamente $1,2 \times 10^9$

linfocitos adquiridos mediante aféresis, se incuban aproximadamente $2,4 \times 10^8$ linfocitos con los vectores virales para la transducción.

En el proceso de 5 días recientemente desarrollado, no se realizaron cambios en el proceso del día 0. Sin embargo, los días 1 y 2 se usó una bolsa más grande. En lugar de usar la bolsa Origen Biomedical PL240 para la transducción, se usó la bolsa Origen Biomedical PL325, o más preferentemente, una bolsa PL750. La bolsa más grande permitió un mayor volumen del vector (200 ml en lugar de 100 ml) y más linfocitos (entre $3,2 \times 10^8$ y 6×10^8 en lugar de $2,4 \times 10^8$) usados en la etapa de transducción.

Curiosamente, el mayor volumen de transducción, junto con más vectores y linfocitos iniciales, no resultó en una reducción inaceptable de la eficiencia de la transducción (54 % a 35,15 %) o la viabilidad celular (92 % a 92,4 %) (ver la **Tabla 1**). En consecuencia, la etapa de expansión celular, que requirió 4 días en el proceso de 7 días, se redujo a 2 días, lo que permitió la recolección de los productos celulares finales el día 5.

Tabla 1. Evaluación del proceso de 5 días frente al proceso de 7 días

Atributo	Promedio de 7 días	Promedio de 5 días
Viabilidad (%)	92	92,4
VCN (copias/célula)	0,4	1,21
CD3+ (%)	91	95,83
Tasa de transducción (%)	54	35,15
IFN-gamma, (pg/ml)	5942	2565

Sin embargo, la modesta reducción de la tasa de transducción no se correlacionó con la eficacia clínica ni con la seguridad del paciente. También es importante destacar que se descubrió que los productos celulares del proceso de 5 días incluían porcentajes aumentados de células juveniles entre las poblaciones de células T CD4+ y CD8+ (**Tabla**

2), lo que se cree que se asocia con una eficacia terapéutica mejorada. Cabe señalar que estas variaciones se encuentran dentro de los rangos históricos de las ejecuciones de donantes recolectados en el proceso de 7 días. Tenga en cuenta que en la Tabla 2 más abajo, los promedios históricos de las ejecuciones del proceso de 7 días se reflejan en la columna denominada “Promedios históricos”, y los datos de las ejecuciones de 5 y 7 días realizadas en el estudio actual se ilustran en las columnas denominadas “5 días” y “7 días”, respectivamente.

Tabla 2. 5 días sesgados hacia células juveniles dentro de rangos históricos

% de tipos de células	Promedios históricos	5 días	7 días
CD4+CM	54,2	50,28	45,5
CD4+ virgen	18,2	<u>40,65</u>	24,6
CD4+Teff/TEMRA	1,33	0,525	1,65
CD4+EM	26,3	8,55	28,3
CD8+CM	63,4	79,8	59,4
CD8+ virgen	2,04	<u>3,93</u>	1,6
CD8+Teff/TEMRA	0,50	0,4	0,33
CD8+EM	34,0	15,85	38,7

CM: Células T de memoria central; Teff: Células T efectoras; EM: Células T de memoria efectora.

Por lo tanto, este ejemplo demuestra que el proceso acortado de 5 días cumplió con los requisitos de especificación de eficiencia, eficacia y seguridad de la transducción. Mientras tanto, los productos de 5 días presentaron un fenotipo más juvenil dentro de los rangos históricos.

La eficacia *in vivo* de los productos celulares del proceso de 5 días se probó en un modelo de ratón implantado con 5×10^5 células Nalm6 (una línea de leucemia linfoblástica aguda (ALL) humana) en una solución de 100 µl, iv. El CAR usado, inyectado el día 6, se dirigió

a CD19, en dosis de 5×10^6 células, 1×10^6 células o $0,2 \times 10^6$ células/kg de peso corporal (Tabla 3).

Tabla 3. Grupos experimentales

Grupo	N	Células primarias	CAR+ dosis/kg
1	5	Vehículo	N/A
2	5	NTD D5	5×10^6
3	5	CD19 CAR D5	5×10^6
4	5	CD19 CAR D5	1×10^6
5	5	CD19 CAR D5	$0,2 \times 10^6$
6	5	CD19 CAR D5	1×10^6 D7 CAR igual
7	5	NTD D7	5×10^6
8	5	CD19 CAR D7	5×10^6
9	5	CD19 CAR D7	1×10^6
10	5	CD19 CAR D7	$0,2 \times 10^6$

5

Los cambios en el peso corporal (Tabla 4), que se correlacionaron con una mayor carga tumoral, indican que todos estos tratamientos fueron seguros para los animales.

Tabla 4. Cambios en los pesos corporales los días posteriores a la implantación del tumor

10

Día	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10
5	0,3	-0,68	0,98	0,28	0,08	-1	-1,36	0,8	-2,14	0,28
8	3,98	3,26	5,68	4,5	2,46	4,28	2,68	4,14	2,38	4,22
13	5,22	2,	6,22	4,74	3,96	2,1	1,98	4,74	1,38	3,22
16	6,58	4,62	9,44	8,08	5,74	5,68	5,5	7,28	3,24	6,84
20	3,28	0	7,08	5,8	5	3,76	1,96	3,62	2,28	5,68
23	-0,38	-6,58	10,3	7,82	8,66	7,2	-7	7,7	6,04	9
26	-5,9	-12,4	11,1	8,54	9,46	9,06	-15,8	9,1	7,22	11,48

29		-21,4	10,2	9,02	9,6	8,88		8,08	5,44	8,66
33			11,6	9,36	9,22	11,06		9,18	7,56	9,78
40			8,76	13,28	12,74	14,1		13,38	10,78	12,62
43			5,28	14,12	13,52	14,34		13,16	12,1	8,1
47			8,43	12,94	13,18	13,36		11,38	11,78	1,4
50			3,58	12,2	11,22	14,96		10,32	12,42	13,95
54			1,53	7,5	9,05	12,26		8,675	8,48	13,85
57			-0,17	8,6	8,475	13,58		9,275	6,68	15,7
61			-2	11,18	4,325	14,36		10,65	13,53	17,3

Los resultados de la inhibición tumoral se muestran en la **Tabla 5** (medidos como fotones/s).

5 Tabla 5. Masa tumoral a los días posteriores a la implantación del tumor

Día	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10
5	3,7e06	6,1e06	5,1e06	5,3e06	2,8e06	2,0e06	7,5e06	7,0e06	6,7e06	4,7e06
8	6,1e07	1,3e08	1,5e06	1,8e07	3,2e07	1,7e07	9,8e07	1,3e06	1,5e07	6,4e07
13	7,7e09	9,5e09	8,1e05	7,2e05	6,9e06	7,5e05	7,0e09	6,7e05	8,1e05	1,5e08
16	1,3e10	1,6e10	7,1e05	7,1e05	7,3e05	8,0e05	1,8e10	7,6e05	8,9e05	2,7e07
20	2,2e10	3,2e10	6,3e05	6,5e05	7,5e05	7,2e05	3,0e10	6,9e05	8,2e05	1,1e06
23	5,1e10	6,4e10	7,7e05	7,6e05	8,7e05	8,0e05	3,8e10	7,7e05	1,6e06	2,0e06
26	4,2e10	1,1e11	7,9e05	7,9e05	1,4e06	9,9e05	1,4e11	7,6e05	4,3e06	8,7e06
29		1,9e11	6,3e05	6,2e05	1,6e06	1,0e06		7,4e05	3,3e06	8,6e06
33			6,3e05	7,1e05	9,2e06	3,3e06		1,4e06	2,9e07	2,8e08
35			7,1e05	9,2e05	1,3e07	1,4e07		6,3e06	1,2e08	8,2e08
40			7,2e05	2,6e06	2,0e08	6,0e07		3,0e07	1,1e09	7,2e09
43			7,6e05	6,0e06	1,2e09	4,4e07		1,8e08	3,4e09	1,0e10
47			9,1e05	1,1e07	2,5e09	2,8e08		5,2e06	1,6e09	6,2e09
50			8,1e05	8,6e06	7,1e09	1,4e09		2,1e06	8,0e09	3,2e09
54			9,4e05	2,6e06	1,3e10	4,6e09		1,4e06	9,9e09	4,4e09
57			9,0e05	1,9e06	8,4e09	7,1e09		1,2e06	9,0e09	4,9e09
61			9,3e05	1,5e06	5,3e09	1,5e09		9,7e05	2,7e09	9,3e09

Cuando se dosificaron 5×10^6 células/kg, los productos celulares del proceso de 5 días mostraron una inhibición completa del crecimiento tumoral. En todas las dosis, los productos celulares del proceso de 5 días superaron a los del proceso de 7 días. Las células del proceso de 5 días también fueron más eficaces que las del proceso de 7 días, incluso cuando el porcentaje de células CAR+ coincidía (es decir, menos células T CAR del proceso de 5 días).

Ejemplo 3: Proceso de elaboración de linfocitos de tres días

Este ejemplo desarrolló un proceso acelerado adicional basado en el proceso de 7 días como se describe en el Ejemplo 1 y el proceso de 5 días como se describe en el Ejemplo 2.

Tal como se usan en todo momento, los términos “proceso de 3 días” y “proceso de elaboración de linfocitos de 3 días” se usan indistintamente y se refieren a un proceso de elaboración de células CAR que dura aproximadamente 3 días después de las etapas iniciales de enriquecimiento y activación. El proceso de 3 días tiene una duración de aproximadamente 4 días desde las etapas iniciales de enriquecimiento y activación hasta una etapa de recolección. El proceso de 3 días no incluye una etapa de expansión celular que comprenda uno o más días después de una etapa de transducción y que preceda a una etapa de recolección.

En este nuevo proceso, los procedimientos de los días 0-1 son similares al proceso de 5 días, incluido el recubrimiento de fibronectina de una bolsa más grande (*p. ej.*, Origen Biomedical PL325 o preferentemente PL750) para la transducción posterior el día 2. Sin embargo, el día 2, solo se usaron aproximadamente $4,8 \times 10^8$ (en lugar de 6×10^8) linfocitos en la etapa de transducción, con la misma cantidad de vectores virales (200 ml). Otra diferencia importante es que, a diferencia de los procesos de 5 y 7 días, no se realizó ninguna etapa específica de expansión de células T. En cambio, los linfocitos transducidos se recolectaron el día 3, lo que

permitió completar todo el proceso dentro de los 3 días posteriores a las etapas iniciales de enriquecimiento y activación.

Dada la falta de una etapa de expansión de células T específica en este proceso de tres días recientemente desarrollado, los productos celulares recolectados incluyeron un porcentaje ligeramente menor de células T (CD3+). Sin embargo, es importante destacar que los productos de 3 días incluyeron un porcentaje aún mayor de células T juveniles (vírgenes) (**Tabla 6**). Tenga en cuenta que en la Tabla 6 más abajo, los promedios históricos de las ejecuciones del proceso de 7 días se reflejan en la columna denominada “Promedios históricos”, y los datos de las ejecuciones de 3 y 7 días realizadas en el estudio actual se ilustran en las columnas denominadas “3 días” y “7 días”, respectivamente.

Tabla 6. Fenotipos de los productos celulares

	Promedios históricos	3 días	7 días
CD4+CM	54,2	39,65	44,55
CD4+ virgen	18,2	<u>55,75</u>	26,75
CD4+Teff/TEMRA	1,33	0,25	1,65
CD4+EM	26,3	4,35	27
CD8+CM	63,4	46,95	63,05
CD8+ virgen	2,04	<u>37,35</u>	2,6
CD8+Teff/TEMRA	0,50	5,9	0,5
CD8+EM	34,0	9,85	33,85

CM: Células T de memoria central; Teff: Células T efectoras; EM: Células T de memoria efectora.

Aunque no se sometieron a pruebas con linfocitos de los mismos donantes, la comparación entre las **Tablas 2 y 6** indica que los porcentajes de células T vírgenes del proceso de 3 días también fueron significativamente mayores que los del proceso de 5 días. Dentro de las células T CD4+, el proceso de 3 días generó aproximadamente

55,75 % de células T vírgenes, mientras que el proceso de 5 días generó aproximadamente 40,65 %; dentro de las células T CD8+, el proceso de 3 días generó aproximadamente 37,35 % de células T vírgenes, mientras que el proceso de 5 días generó aproximadamente 3,93 %.

5 Dicho en otros términos, el proceso de 3 días genera aproximadamente un aumento de 1,4 veces en el porcentaje de células T CD4+ vírgenes versus el porcentaje de tales células observadas en el proceso de 5 días, y aproximadamente un aumento de 9,5 veces en el porcentaje de células T CD8+ vírgenes versus el porcentaje de tales células observadas en el proceso de 5 días. Además, el proceso de 3 días genera aproximadamente un
10 aumento de 3,0 veces en el porcentaje de células T CD4+ vírgenes versus el promedio histórico de tales células observadas en el proceso de 7 días, y aproximadamente un aumento de 18,0 veces en el porcentaje de células T CD8+ vírgenes versus el promedio histórico de tales células observadas en el proceso de 7 días.

A la inversa, dentro de las células T CD4+, el proceso de 3 días generó solo
15 aproximadamente 4,35 % de células T de memoria efectora, mientras que el proceso de 5 días generó aproximadamente 8,55 %; dentro de las células T CD8+, el proceso de 3 días solo generó aproximadamente 9,85 % de células T de memoria efectora, mientras que el proceso de 5 días generó aproximadamente 15,85 %.

Dicho en otros términos, el proceso de 3 días genera aproximadamente una disminución
20 de 2,0 veces en el porcentaje de células T de memoria efectora CD4+ versus el porcentaje de tales células observadas en el proceso de 5 días, y aproximadamente una disminución de 1,6 veces en el porcentaje de células T de memoria efectora CD8+ versus el porcentaje de tales células observadas en el proceso de 5 días. Además, el proceso de 3 días genera aproximadamente una disminución de 6,0 veces en el porcentaje de células T de memoria
25 efectora CD4+ versus el promedio histórico de tales células observadas en el proceso de 7 días, y aproximadamente una disminución de 3,5 veces en el porcentaje de células T de

memoria efectora CD8+ versus el promedio histórico de tales células observadas en el proceso de 7 días.

Además, como se puede apreciar en la Tabla 6, el porcentaje de células CD4+ CCR7+ (es decir, células CM y vírgenes) en la población recolectada final del proceso de 3 días es al

5 menos 95 % de la población de células T CD4+ recolectadas. Dicho de otra manera, el porcentaje máximo de células Teff/TEMRA y EM CD4+ en la población final recolectada del proceso de 3 días es aproximadamente 5 %. Por lo tanto, hay al menos 19 veces más células CD4+ CCR7+ en la población recolectada que células Teff/TEMRA y EM CD4+. En comparación, el porcentaje de células CD4+ CCR7+ (es decir, células CM y vírgenes) en

10 la población recolectada final del proceso de 7 días es aproximadamente 71 % de la población de células T CD4+ recolectadas. Dicho de otra manera, el porcentaje máximo de células Teff/TEMRA y EM CD4+ en la población final recolectada del proceso de 7 días es aproximadamente 29 %. Por lo tanto, el proceso de 3 días genera una población de células T CD4+ con un aumento de aproximadamente 1,3 veces en el porcentaje de células CD4+ CCR7+ que el proceso de 7 días, y con una disminución de aproximadamente 5 veces en el porcentaje de células Teff/TEMRA y EM CD4+.

Como también se observa en la Tabla 6, el porcentaje de células CD8+ CCR7+ (es decir, células CM y vírgenes) en la población recolectada final del proceso de 3 días es al menos

84 % de la población de células T CD8+ recolectadas. Dicho de otra manera, el porcentaje máximo de células Teff/TEMRA y EM CD4+ en la población final recolectada del proceso de 3 días es aproximadamente 16 %. Por lo tanto, hay al menos aproximadamente 5 veces más células CD8+ CCR7+ en la población recolectada que células Teff/TEMRA y EM CD4+. En comparación, el porcentaje de células CD8+ CCR7+ (es decir, células CM y vírgenes) en la población recolectada final del proceso de 7 días

25 es aproximadamente 66 % de la población de células T CD8+ recolectadas. Dicho de otra manera, el porcentaje máximo de células Teff/TEMRA y EM CD8+ en la población final recolectada del proceso de 7 días es aproximadamente 34 %. Por lo tanto, el proceso de

3 días genera una población de células T CD8+ con un aumento de aproximadamente 1,3 veces en el porcentaje de células CD8+ CCR7+ que el proceso de 7 días, y con una disminución de aproximadamente 2 veces en el porcentaje de células Teff/TEMRA y EM CD8+.

- 5 Las mediciones de viabilidad celular mostraron que, durante el proceso de 3 días, la viabilidad celular se mantuvo alta (>90 %), mientras que la etapa de lavado en el día 2 causó la mayor reducción en la viabilidad celular. Por el contrario, los procesos de 5 y 7 días incluyeron etapas de lavado adicionales, cada uno de los cuales contribuyó a una caída adicional en la viabilidad celular (**Tabla 7**).

10

Tabla 7. Cambios en la viabilidad celular durante el proceso

Día/viabilidad %	Día 3	Día 7 (control)
D0 Aph	99,3	99,3
D0 - limpieza posterior	99,1	99,1
D0 - sembrado posterior	99,2	99
D2 - lavado posterior	92,9	92,2
D2 - sembrado posterior	91	92,7
D3 - prelavado	92,6	94,4
D3 - lavado posterior	81,5	89,2
D3 - sembrado posterior		87,6
D5		97,6
D6		97,8
D7 - prelavado		97,1
D7 - lavado posterior		92,6

Ejemplo 4: Eficacia in vivo de las células preparadas mediante el proceso de tres días

- 15 Este ejemplo comparó la eficacia *in vivo* de las células preparadas mediante el proceso de 3 días como se describe en el Ejemplo 3, con aquellas del proceso de 7 días, con el mismo modelo animal y procedimiento como se describe en el **Ejemplo 2**.

Los grupos de experimento se muestran en la **Tabla 8** y los cambios de peso corporal se muestran en la **Tabla 9**.

Tabla 8. Grupos experimentales

5

Grupo	N	Células primarias	CAR+ dosis/kg
1	5	Vehículo	Vehículo
2	5	NTD D3	3×10^6
3	5	NTD D3	$0,5 \times 10^6$
4	5	NTD D7	3×10^6
5	5	NTD D7	$0,5 \times 10^6$
6	5	CD19 CAR D3	3×10^6
7	5	CD19 CAR D3	1×10^6
8	5	CD19 CAR D3	$0,5 \times 10^6$
9	5	CD19 CAR D7	3×10^6
10	5	CD19 CAR D7	1×10^6
11	5	CD19 CAR D7	$0,5 \times 10^6$

Tabla 9. Cambios en los pesos corporales los días posteriores a la implantación del tumor

Día	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11
5	0,3	0,64	1,54	0,48	-0,6	-0,1	0,02	-0,16	0,76	0,46	0,3
8	6,46	5,78	10,98	9,62	7,72	7,06	5,74	4,8	7,84	8,2	5,6
12	11,58	11,62	13,62	13,42	11,54	11,76	10,08	8,32	13,88	10,82	9,24
15	13,26	12,78	14,88	15,1	13,52	12,42	11,94	11,38	14,6	13,18	10,84
20	-4,78	-4,52	-1,43	-0,54	-9,95	7,42	13,18	10,7	14,34	10,6	13,1
23						3,48	12,52	10,26	12,8	10,2	12,38
26						3,5	13,94		13,4	11,62	11,18
34						-8,13	12,24	7,56	10,5	6,36	-8,95
40						-10,63	7,16	10,3	11,7	-1,2	
47							1,72	15,98	5,28		
61								7,7	10,68		
68							19,25	10,07	11,1		

Los resultados de la inhibición tumoral se muestran en la **Tabla 10** (medidos como fotones/s).

Tabla 10. Masa tumoral a los días posteriores a la implantación del tumor

5

Día	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11
5	2,5e06	2,0e06	2,5e06	1,8e06	2,0e06	1,5e06	2,8e06	1,8e06	1,4e06	1,8e06	1,4e06
8	2,3e07	2,2e07	2,3e07	9,5e06	1,7e07	4,4e06	1,4e07	1,4e07	7,5e05	2,0e06	3,9e06
12	4,8e08	3,0e08	4,4e08	4,1e08	6,7e08	6,9e05	1,7e06	3,2e06	6,8e05	8,0e05	2,7e06
15	4,1e09	3,6e09	4,1e09	1,7e09	6,6e09	7,2e05	6,8e05	1,1e06	8,2e05	1,3e06	8,8e06
20	1,6e10	1,7e10	2,7e10	1,3e10	1,7e10	7,4e05	6,8e05	7,7e05	8,0e05	8,8e06	8,2e07
23				3,1e10	3,1e10	7,7e05	6,2e05	7,2e05	6,7e05	3,1e07	1,7e08
26						9,8e05	6,6e05	6,8e05	2,3e06	4,2e08	2,4e09
30						1,0e06	7,5e05	8,5e05	1,1e08	3,9e09	1,4e10
34						7,2e05	6,3e05	6,2e05	8,5e08	7,2e09	2,3e10
37						7,8e05	7,8e05	7,9e05	1,9e09	1,4e10	2,3e10
40						8,9e05	9,4e05	9,4e05	4,2e09		
47							6,3e05	8,7e05	1,1e10		
61							8,6e05	1,0e06	6,8e09		
68							6,7e05	8,6e05	5,2e09		

En las tres dosis ($0,5\times$, $1\times$, y 3×10^6 células/kg), los productos celulares del proceso de 3 días fueron capaces de inhibir completamente el crecimiento tumoral a lo largo del periodo de observación, sin marcadas diferencias. Por el contrario, las células del proceso de 7 días solo pudieron inhibir el crecimiento tumoral durante 15 días ($0,5$ y 1×10^6 células/kg) y 23 días (3×10^6 células/kg).

Por lo tanto, este ejemplo demuestra que el proceso de 3 días es capaz de preparar productos celulares con una eficacia antitumoral muy mejorada en comparación con el proceso de 7 días. Además, dada la eficacia enormemente mejorada, se requiere una dosis mucho más baja para lograr una respuesta antitumoral mucho más completa.

10

15

En otro experimento una dosis aún menor de las células del proceso de 3 días ($0,2 \times 10^6$ células/kg; tres donantes diferentes) se compararon con una dosis alta (1×10^6 células/kg) del proceso de 7 días. Los resultados (**Tabla 11**) muestran que, incluso con una diferencia de 5 veces, los resultados del proceso de 3 días fueron muy superiores a los de 7 días.

5

Tabla 11. Masa tumoral a los días posteriores a la implantación del tumor

Día	Vehículo	Día 7 a 1×10^6	Día 3 a $0,2 \times 10^6$	Día 3 a $0,2 \times 10^6$	Día 3 a $0,2 \times 10^6$
6	5,63e07	7,7e07	9,2e07	1,0e08	5,1e07
12	1,45e10	3,7e07	6,5e09	1,5e10	1,3e10
15	3,09e10	2,5e06	7,6e08	1,9e09	8,2e09
19	7,61e10	1,2e06	1,3e06	1,6e06	1,4e06
22	1,02e11	1,2e06	1,2e06	1,4e06	1,5e06
26		2,6e06	1,2e06	1,3e06	1,5e06
29		4,9e06	1,0e06	1,4e06	1,4e06
33		6,0e06	1,1e06	1,3e06	1,5e06
36		9,9e06	1,0e06	1,3e06	1,3e06
40		4,1e07	9,2e05	9,2e05	1,3e06
43		1,9e08	1,3e06	1,4e06	1,8e06
47		1,8e09	1,0e06	1,2e06	2,3e06
54		3,5e10	9,5e05	1,2e06	3,6e06
61		7,4e10	9,4e05	1,6e06	1,4e07
68		4,4e09	1,1e06	1,4e06	3,2e07
75		1,1e10	1,1e06	1,2e06	6,3e07
82		2,6e10	1,1e06	1,0e06	2,1e08
89		9,7e09	1,0e06	1,0e06	6,3e09

Ejemplo 5: Impacto de la recolección temprana en CAR

- 10 Este ejemplo descubrió que el rendimiento mejorado del proceso abreviado (recolección temprana) era más pronunciado cuando la construcción CAR incluía un dominio coestimulador CD28, en comparación con un dominio coestimulador 4-1BB.

Ambos tipos de CAR incluían un fragmento de unión al antígeno de unión a CD19, mientras que el CAR núm. 1 incluía un dominio coestimulador CD28 y el CAR núm. 2 incluía un dominio coestimulador 4-1BB, ambos administrados por un vector lentiviral. Las células se recolectaron el día 4, el día 7 y el día 14, y las dosis para el estudio en animales *in vivo* incluyeron $0,2 \times 10^6$ células/kg y 1×10^6 células/kg (**Tabla 12**). Los resultados se muestran en la **Tabla 13**.

Tabla 12. Grupos experimentales

Grupo	N	Células primarias	CAR+ dosis/kg
G1	5	Vehículo	Vehículo
G2	5	NTD_D14 1e6	1×10^6
G3	5	CD19-CD28_D4	$0,2 \times 10^6$
G4	5	CD19-CD28_D7	1×10^6
G5	5	CD19-CD28_D7	$0,2 \times 10^6$
G7	5	CD19-CD28_D14	$0,2 \times 10^6$
G8	5	CD19-41BB_D4	$0,2 \times 10^6$
G9	5	CD19-41BB_D7	1×10^6
G10	5	CD19-41BB_D7	$0,2 \times 10^6$
G12	5	CD19-41BB_D14	$0,2 \times 10^6$

Tabla 13. Masa tumoral a los días posteriores a la implantación del tumor

Día	G1	G2	G3	G4	G5	G7	G8	G9	G10	G12
5	3,1e06	2,5e06	1,3e06	1,2e06	1,7e06	3,4e06	2,3e06	8,3e05	1,1e06	1,1e06
8	3,5e07	2,6e07	6,0e06	1,0e06	7,0e06	2,4e07	2,5e07	1,3e06	3,9e06	3,6e06
11	7,8e08	5,2e08	2,1e07	7,4e05	1,1e07	7,8e07	1,5e08	7,5e05	9,1e06	3,8e06
14	5,7e09	6,1e09	1,5e06	1,2e06	5,8e06	5,7e07	4,6e07	8,7e05	7,3e06	3,6e06
18			7,9e05	1,0e06	2,0e06	4,0e07	3,3e06	9,7e05	1,8e07	1,9e07
21			8,0e05	1,8e06	6,1e06	4,3e07	1,1e06	1,3e06	2,0e07	1,1e08
25			9,9e05	7,7e06	7,9e07	2,0e08	1,4e06	1,7e06	5,7e07	5,3e08
28			1,2e06	4,7e07	6,4e08	1,6e09	3,6e06	6,1e06	4,7e08	3,1e09
32			9,5e05	3,2e08	5,7e09		1,8e07	4,6e07	5,5e09	

35			1,2e06	2,5e09	9,3e09		7,9e07	3,7e08	1,6e10	
39			3,3e06				1,2e09	1,1e09		
42			1,3e07				8,4e08	9,5e08		
46			9,9e07				9,8e06	3,3e08		
49			5,3e08				2,9e07	6,6e08		
53			2,9e08				3,9e08	1,1e09		
56			1,1e07				2,7e09			
60			8,2e06				1,0e10			
62			1,3e07							
67			1,5e07							
70			7,1e06							
74			2,3e06							
77			2,6e06							
81			2,8e06							
84			1,7e07							
88			8,4e07							

Como se muestra en **la Tabla 13**, con recolección tardía (día 7 o 14), la diferencia de rendimiento entre los dos constructos fue limitada. Sin embargo, con la recolección temprana que benefició a ambos constructos, CAR núm. 1 (G3) presentó una eficacia *in vivo* significativamente mayor que CAR núm. 2 (G8).

Además, un CAR que se dirige a CD19 e incluye un dominio coestimulador de CD28 se sometió a pruebas *in vivo* con el modelo de leucemia en ratón Nalm6. Los resultados mostraron que la recolección temprana (día 4) condujo a una mejor eficacia antitumoral *in vivo* que la recolección regular (día 7), que a su vez fue más efectiva que la recolección tardía (día 14). De hecho, una dosis baja (2×10^5 células) de células T recolectadas el día 4 fue 5 veces más efectiva que una dosis alta (10^6 células) de células T recolectadas el día 7.

Ejemplo 6: Eficacia in vivo de las células preparadas mediante el proceso de tres días

Este ejemplo complementa el Ejemplo 4 y presenta datos adicionales que comparan la eficacia *in vivo* de las células T CAR anti-CD19 preparadas mediante el proceso de 3 días descrito en el Ejemplo 3, con aquellas preparadas mediante el proceso de 7 días.

- 5 Las células T CAR anti-CD19 preparadas mediante el proceso de 3 días y las células T CAR anti-CD19 preparadas mediante el proceso de 7 días junto con sus respectivas células no transducidas (NTD, por sus siglas en inglés) del día 3 y del día 7 se elaboraron a partir de un donante humano sano. Se implantaron células NALM6-luc (5×10^5 células) por IV mediante la vena lateral de la cola en ratones NSG hembra de 8 semanas de edad (5 ratones por
- 10 grupo). El día 6 después de la implantación del tumor, los ratones recibieron controles (NTD del día 3 o NTD del día 7) en una cohorte de dosis única o productos de células T CAR anti-CD19 como cohortes de dosis múltiples. Se sometieron a pruebas un total de 5 cohortes de dosis (1×10^6 , 5×10^5 , 3×10^5 , 2×10^5 y 1×10^5 células T CAR⁺) de células derivadas del proceso de 3 días, y 4 cohortes de dosis (1×10^7 , 5×10^6 , 3×10^6 y 1×10^6 células T CAR⁺)
- 15 de células derivadas del proceso de 7 días. La actividad antitumoral se evaluó determinando los efectos de los productos de células T CAR anti-CD19 sobre la carga tumoral y la supervivencia de los animales.

- La actividad antitumoral se evaluó mediante la evaluación del cambio en la carga tumoral medida mediante imágenes de bioluminiscencia (BLI, por sus siglas en inglés) desde el día
- 20 5 (1 día antes del tratamiento con células T CAR) hasta el día 22 (16 días después del tratamiento con células T CAR y el último momento en el que todos los grupos estaban intactos). Se observó inhibición del crecimiento tumoral en las 4 cohortes de dosis de ratones tratados con células T CAR anti-CD19 derivadas del proceso de 7 días y en las 5 cohortes de dosis de células T CAR anti-CD19 derivadas del proceso de 3 días (Tablas 14,
- 25 15 y 16). Para las células T CAR anti-CD19 derivadas del proceso de 3 días, la inhibición del crecimiento tumoral en comparación con el grupo sin tratamiento fue 128,1 %, 126,7 %, 117,7 %, 113,4 % y 65,7 % en los animales tratados con 1×10^6 , 5×10^5 , 3×10^5 , 2×10^5

y 1×10^5 células T CAR⁺, respectivamente. Para las células T CAR anti-CD19 derivadas del proceso de 7 días, la inhibición del crecimiento tumoral osciló entre 109,0 % y 115,1 % para las cohortes de dosis sometidas a pruebas (Tabla 16). La carga tumoral retrocedió el día 22 en todos los grupos y en todas las dosis de células T CAR⁺ sometidas a pruebas, excepto en la cohorte de dosis de células T CAR⁺ de 1×10^5 de células T CAR anti-CD19 preparadas mediante el proceso de 3 días, para lo cual se produjo un retraso en el control del tumor el día 26. La eficacia antitumoral en todas las dosis de células T CAR anti-CD19 preparadas mediante el proceso de 3 días y células T CAR anti-CD19 preparadas mediante el proceso de 7 días alcanzó significación estadística el día 22 en comparación con los ratones que no recibieron tratamiento o controles de NTD (la prueba posterior de Tukey, $p < 0,05$ se consideró significativa).

Tabla 14. Grupos de experimentos para los resultados presentados en las Tablas 15 y 16

Grupo	N	Células primarias	CAR+ dosis/kg
G1	5	Sin tratamiento	N/A
G2	5	NTD_D3	1×10^6
G3	5	NTD_D7	1×10^7
G4	5	CD19-CD28_D3	1×10^5
G5	5	CD19-CD28_D3	2×10^5
G6	5	CD19-CD28_D3	3×10^5
G7	5	CD19-CD28_D3	5×10^5
G8	5	CD19-CD28_D3	1×10^6
G9	5	CD19-CD28_D7	1×10^6
G10	5	CD19-CD28_D7	3×10^6
G11	5	CD19-CD28_D7	5×10^6
G12	5	CD19-CD28_D7	1×10^7

Tabla 15. Masa tumoral en los días posteriores a la implantación del tumor (presentada como el valor promedio observado para cada grupo por momento; unidades = fotones/s)

Día	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
5	2,10E+06	4,76E+06	3,22E+06	2,24E+06	2,23E+06	3,52E+06	7,51E+06	8,42E+06	2,28E+06	6,95E+06	2,70E+06	2,64E+06
8	5,87E+06	3,64E+07	2,32E+07	8,95E+06	9,52E+06	8,38E+06	6,03E+07	1,07E+08	1,21E+07	5,68E+06	9,15E+05	6,19E+05
13	4,04E+09	8,69E+09	2,10E+09	1,81E+08	1,18E+07	2,03E+06	1,66E+06	7,77E+05	1,17E+06	6,17E+05	7,19E+05	7,00E+05
16	9,43E+09	1,49E+10	1,11E+10	3,06E+07	6,67E+05	6,06E+05	6,58E+05	7,01E+05	6,93E+05	1,30E+06	6,26E+05	6,70E+05
19	1,38E+10	2,64E+10	1,70E+10	3,83E+07	6,12E+05	/5,69E+0 5	5,07E+05	5,24E+05	6,79E+05	3,11E+06	5,96E+05	5,50E+05
22	3,12E+10	4,96E+10	2,53E+10	5,80E+07	5,70E+05	5,11E+05	5,44E+05	5,70E+05	9,69E+05	5,05E+06	6,55E+05	6,06E+05
26		8,22E+10	9,81E+10	6,19E+05	6,32E+05	5,64E+05	5,70E+05	5,47E+05	6,81E+06	4,54E+06	7,32E+05	6,30E+05
29				4,73E+05	5,06E+05	4,54E+05	4,80E+05	5,37E+05	1,23E+07	1,16E+07	1,21E+06	5,85E+05
33				4,98E+05	5,31E+05	6,04E+05	5,91E+05	1,29E+06	3,04E+08	3,37E+07	3,75E+06	6,65E+05
36				4,66E+05	5,25E+05	5,86E+05	5,67E+05	4,18E+06	1,55E+09	1,21E+08	1,87E+07	5,60E+05
40				6,06E+05	6,52E+05	8,47E+05	7,41E+05	1,47E+07	5,75E+09	3,11E+08	6,73E+07	6,92E+05
43				5,70E+05	5,79E+05	7,31E+05	6,16E+05	2,19E+07	8,45E+09	1,10E+09	2,48E+08	6,90E+05
47				4,77E+05	4,16E+05	6,66E+05	6,63E+05	1,33E+07	5,27E+09	3,59E+09	6,25E+08	7,02E+05
50				5,28E+05	4,58E+05	6,94E+05	7,34E+05	1,78E+07	7,42E+09	9,60E+09	3,55E+09	8,75E+05
54				6,66E+05	6,25E+05	8,24E+05	8,70E+05	3,39E+07	1,48E+10	7,90E+09	2,83E+09	3,07E+06

57				5,72E+05	4,19E+05	6,15E+05	6,68E+05	3,79E+07	1,66E+10	8,29E+09	5,05E+09	1,17E+07
61				5,54E+05	6,59E+05	6,42E+05	6,41E+05	6,26E+05	7,12E+09	4,72E+09	8,92E+08	5,74E+07
64				6,08E+05	5,06E+05	6,29E+05	5,88E+05	5,39E+05	8,40E+09	6,19E+09	1,26E+09	1,22E+08

Tabla 16. Análisis de transformación logarítmica de la carga tumoral

	G1	G2	G3	G8	G7	G6	G5	G4	G12	G11	G10	G9
Día 5	6,31	6,58	6,49	6,92	6,85	6,45	6,32	6,33	6,41	6,42	6,83	6,34
Día 22	10,48	10,69	10,38	5,75	5,73	5,71	5,75	7,76	5,78	5,81	6,25	5,97
Cambio, día 5 a día 22	4,17	4,11	3,89	-1,17	-1,11	-0,74	-0,56	1,43	-0,63	-0,61	-0,58	-0,38
$\Delta T/\Delta C$ (%)	100,0	98,4	93,3	-28,1	-26,7	-17,7	-13,4	34,3	-15,1	-14,6	-13,9	-9,0
Inhibición del crecimiento tumoral, día 22 (%)	0,0	1,6	6,7	128,1	126,7	117,7	113,4	65,7	115,1	114,6	113,9	109,0

En la Tabla 16, la carga tumoral (medida por BLI) se normalizó $\log_{10}$, con las medias para cada cohorte en el día 5 y el día 20 del estudio representadas en la tabla. Se calculó el cambio en el BLI tumoral del día 5 al día 20, y el cambio porcentual en la carga tumoral en relación con el grupo sin tratamiento se calcula como DT/DC. La inhibición del crecimiento tumoral se definió como $(1-[DT/DC] \times 100)$ y representó el cambio porcentual del volumen del tumor en los brazos de tratamiento en relación con el control (es decir, ratones que no recibieron tratamiento). Una inhibición del crecimiento tumoral (TGI, por sus siglas en inglés) de 0 % indica que el crecimiento tumoral medio del grupo fue comparable al crecimiento tumoral medio observado en el grupo sin tratamiento, mientras que una TGI de 100 % indica que no se observó crecimiento tumoral entre el día 5 y el día 20. Una TGI > 100 % indica que la carga tumoral media retrocedió del día 5 al día 20, mientras que una TGI < 0 indica un aumento de la carga tumoral mayor que el aumento observado en el grupo sin tratamiento (G1).

El tratamiento de ratones con células T CAR anti-CD19 preparadas mediante el proceso de 3 días o células T CAR anti-CD19 preparadas mediante el proceso de 7 días resultó en una supervivencia prolongada en comparación con los ratones de control que recibieron NTD o ningún tratamiento. Los controles de NTD y los ratones que no recibieron tratamiento abandonaron el estudio el día 8 basado en el punto de referencia de supervivencia definido por una carga tumoral $<5 \times 10^8$ fotones/segundo de bioluminiscencia. Por el contrario, los grupos tratados con células T CAR anti-CD19 preparadas mediante el proceso de células de 3 días experimentaron una supervivencia significativamente mayor, y los ratones de todas las cohortes de dosis lograron una supervivencia de 100 % en el punto final del estudio el día 64. Los ratones tratados con células T CAR anti-CD19 preparadas mediante el proceso de 7 días tuvieron una menor supervivencia en comparación con los grupos tratados con células T CAR anti-CD19 preparadas mediante el proceso de 3 días, que varían de 80 % de supervivencia para la cohorte de dosis de células T CAR⁺ de 1×10^7 con una supervivencia de 20 % para la

cohorte de dosis de células T CAR⁺ de 5×10^6 y una supervivencia de 0 % para las cohortes de dosis de células T CAR⁺ de 3×10^6 y 1×10^6 .

Los ratones que recibieron células T CAR anti-CD19 preparadas mediante el proceso de 3 días en todas las dosis lograron una mejora estadísticamente significativa en la respuesta en relación con aquellos que recibieron células T CAR anti-CD19 preparadas mediante el proceso de 7 días a las dosis de células T CAR⁺ de 3×10^6 y 1×10^6 , pero no fueron estadísticamente diferentes de la dosis de células T CAR⁺ de 1×10^7 de células T CAR anti-CD19 preparadas mediante el proceso de 7 días. Todas las dosis de células T CAR anti-CD19 preparadas mediante el proceso de 3 días resultaron en respuestas antitumorales completas y una supervivencia de 100 % al final del estudio (día 64), mientras que la dosis más alta de células T CAR anti-CD19 preparadas por el proceso de 7 días (células T CAR⁺ de 1×10^7) resultó en una supervivencia al final del estudio de 80 %.

Por último, el aumento de la carga tumoral con el tiempo en el grupo sin tratamiento provocó una pérdida media de peso corporal de >18 % en el día 26 y/o signos clínicos adversos, después de lo cual todos los animales se retiraron del estudio. Los animales que recibieron células T NTD mostraron un patrón similar de pérdida de peso debido a la carga tumoral no controlada en el día 29. Por el contrario, todas las dosis de células T CAR anti-CD19 preparadas mediante el proceso de 3 días de células de 1×10^6 a 1×10^5 se toleraron bien, y los animales mantuvieron un peso corporal constante durante todo el estudio. Para los grupos tratados con células T CAR anti-CD19 preparadas mediante el proceso de 7 días, todos los ratones en todas las dosis analizadas (células T CAR⁺ de 1×10^7 , 5×10^6 , 3×10^6 y 1×10^6), mantuvieron un peso corporal constante durante la duración del estudio.

Ejemplo 7: Caracterización de células preparadas mediante un proceso de tres días

Este ejemplo describe la caracterización funcional y fenotípica de las células T CAR anti-CD19/CD20 que se recolectaron el día 3 en comparación con las células T CAR anti-CD19/CD20 que se recolectaron el día 6.

- 5 Brevemente, se activaron y transdujeron células T CD4⁺ y CD8⁺ seleccionadas positivamente de un donante humano sano usando un vector lentiviral que codifica un CAR anti-CD19 y un CAR anti-CD20 de doble diana. Las células transducidas se recolectaron posteriormente el día 3. Similarmente, se fabricó otro conjunto de productos de células T CAR anti-CD19/CD20 a partir de células T del mismo donante pero se recolectaron el día 6 (denominado en los
- 10 Ejemplos 7 y 8 como “día 6 de CAR anti-CD19/CD20”). Posteriormente, ambos productos de células T CAR se caracterizaron funcionalmente y se compararon con sus respectivas células T de control NTD (día 3 de NTD y día 6 de NTD) que se elaboraron en paralelo a partir del mismo material donante.

- Las células T CAR anti-CD19/CD20 que se recolectaron el día 3 se produjeron mediante
- 15 el siguiente proceso de 3 días que comenzó con la recolección del material de aféresis. El material de aféresis de partida puede ser opcionalmente células T criopreservadas o de aféresis frescas o criopreservadas. Las etapas de lavado 1, lavado 2, enriquecimiento de células T y lavado 3 se realizaron el día 0. La activación de células T se realizó desde el día 0 hasta el día 1. La transducción lentiviral se realizó el día 1 hasta el día 4. El lavado y
- 20 concentrado de la recolección se realizó el día 3 hasta el día 4.

- Las células T CAR anti-CD19/CD20 que se recolectaron el día 6 se produjeron mediante el siguiente proceso que comenzó con la recolección del material de aféresis. Las etapas de lavado 1, lavado 2, enriquecimiento de células T y lavado 3 se realizaron el día 0. La activación de células T se realizó desde el día 0 hasta el día 2. La transducción lentiviral
- 25 se realizó el día 2 hasta el día 5. El lavado 4 se realizó el día 4 hasta el día 5. La expansión de células T se realizó desde el día 4 hasta el día 15. El lavado y concentrado de la recolección se realizó el día 6 hasta el día 15.

Los grupos de experimentos para los estudios descritos en este Ejemplo se muestran en la **Tabla 17.**

Tabla 17. Grupos experimentales

5

Grupo	Células primarias
1	NTD D3
2	anti-CD19/CD20 CAR D3
3	NTD D6
4	anti-CD19/CD20 CAR D6

Se evaluaron las células T CAR anti-CD19/CD20 producidas por el proceso de 3 días y los productos de células T CAR anti-CD19/CD20 del día 6 de la expresión de la superficie celular CAR para establecer eficiencias de transducción CAR. La expresión en la superficie celular tanto del CAR anti-CD19 como del CAR anti-CD20 se detectó individualmente mediante citometría de flujo usando anticuerpos antiidiotípicos marcados con fluorescencia. La expresión individual del CAR anti-CD19 fue de 68 % para las células T CAR anti-CD19/CD20 producidas mediante el proceso de 3 días y de 35 % para el producto de células T CAR anti-CD19/CD20 del día 6, y la expresión de CAR antiCD20 fue de 65 % y 37 %, respectivamente, en las mismas muestras. La eficiencia de transducción, medida por la suma de la expresión total de CAR anti-CD19 y antiCD20 (es decir, porcentaje de células de anticuerpos CAR anti-CD19⁺ más porcentaje de células de anticuerpos CAR anti-CD29⁺), fue de 72 % para células T CAR anti-CD19/CD20 producidas mediante el proceso de 3 días y 40 % para el producto de células T CAR antiCD19/CD20 del día 6.

La caracterización fenotípica de los productos de células T CAR se realizó mediante citometría de flujo después de la incubación con anticuerpos marcados con fluorescencia para evaluar la presencia de células CD4⁺ y CD8⁺, y la composición relativa de subconjuntos de células T menos diferenciadas. Los marcadores CD45RA y CCR7 se

pueden usar para definir las diversas poblaciones de células T, incluidas las células T vírgenes y de memoria madre (CD45RA⁺CCR7⁺), también denominadas células T juveniles. Las células T CAR anti-CD19/CD20 producidas mediante el proceso de 3 días mostraron una relación CD4/CD8 ligeramente mayor que el producto de células T CAR anti-CD19/CD20 del día 6 (**Tabla 18**).

Tabla 18. Relación CD4/CD8 (% de CD3)

	CD4	CD8
G1	55,8	41,4
G2	53,8	42,1
G3	51,9	47,1
G4	49,2	48,6

Tanto las poblaciones CD4⁺ como CD8⁺ de células T CAR anti-CD19/CD20 producidas mediante el proceso de 3 días mostraron una mayor frecuencia de células juveniles en comparación con el producto de células T CAR anti-CD19/CD20 del día 6 (**Tabla 19** y **Tabla 20**).

Tabla 19. CD45RA⁺CCR7⁺ (% de CD4)

G1	G2	G3	G4
67,3	71,7	31,3	22,8

Tabla 20. CD45RA⁺CCR7⁺ (% de CD8)

G1	G2	G3	G4
82,6	83,4	52,1	42,6

La funcionalidad de los productos de células T CAR se evaluó en ensayos de cocultivo con células diana positivas y negativas para antígeno. Se incluyeron productos de células T NTD en los experimentos como controles para evaluar los niveles de alorreactividad. La citotoxicidad se midió a 1 día y 4 días después del inicio del cocultivo de los productos de células T con células diana que expresan luciferasa. La citotoxicidad se midió como la reducción de la señal de luciferasa emitida en los pocillos de prueba tras la adición de luciferina en comparación con los pocillos en los que se sembraron células diana solas. En estos ensayos se usaron múltiples relaciones E:T que varían de 1:1 y 1:243. Se usaron cuatro líneas celulares principales que expresan diversos niveles de antígeno CD19 y CD20: Raji, una línea celular de linfoma de células B que expresa altos niveles de antígenos CD19 y CD20; Nalm6, una línea celular de leucemia de células B que expresa niveles altos de CD19 pero niveles bajos de CD20; ST486, una línea celular de linfoma de células B que expresa niveles bajos de CD19 pero niveles altos de CD20; y K-562, una línea celular de leucemia mielógena crónica que no expresa los antígenos CD19 o CD20. Además, los controles consistieron en células Raji CD19 inactivas (KO, por sus siglas en inglés) y células Raji CD20KO. Se diseñaron líneas celulares Raji para expresar cualquiera de los antígenos: Las células Raji CD19KO solo expresan CD20 y no CD19, Raji CD20KO solo expresa CD19 y no CD20. El antígeno KO se confirmó a nivel de ADN mediante el seguimiento de inserciones o eliminaciones (indeles) mediante análisis de descomposición (TIDE, por sus siglas en inglés) y a nivel de proteína de la superficie celular mediante citometría de flujo.

En el día 4 del cocultivo, las células T CAR anti-CD19/CD20 producidas mediante el proceso de 3 días y los productos de células T CAR anti-CD19/CD20 del día 6 mostraron una citotoxicidad específica dependiente de la dosis comparable contra células diana positivas para antígeno, independientemente de la expresión de ambos o cualquiera de los antígenos (**Tablas 21A-21F**). Los niveles iniciales de citotoxicidad independiente de antígeno mediada por alorreactividad contra células diana se observaron mediante citotoxicidad de células T de control NTD D3 en células ST486 (expresión baja de CD19/expresión alta de CD20) en la

ET_relación	G2			G4			G1			G3		
0,0041	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,037	34,93	31,91	22,59	30,28	27,98	21,04	0	0	0	0	0	0
0,11	87,23	84,35	83,47	73,04	64,55	64,67	0	0	0	0	0	0
0,33	99,11	98,74	98,51	95,66	96,45	98,11	8,16	7,59	0,28	0	0	0
1	99,79	99,65	99,65	99,73	99,76	99,69	61,53	54,83	55,11	0	0	0

ET_relación	G2			G4			G1			G3		
0,0041	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,037	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,11	60,09	62,71	66,74	26,08	31,46	29,1	0	0	0	0	0	0
0,33	99,01	98,95	98,45	91,1	91,74	92,73	0	0	0	0	0	0
1	99,94	99,92	99,95	99,8	99,64	99,78	0	0	0	0	0	0

[illegible]

ET_relació n	G2			G4			G1			G3		
0,0041	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,012	1,97	0,02	5,07	0	0	3,64	0	0	0	0	0	0
0,037	4,02	12,24	3,54	3,4	11,08	4,41	0	0	0	0	0	0
0,11	7,88	11,55	10,77	9,01	11,11	17,12	0	0	0	0	0	0
0,33	27,08	34,69	27,04	21,47	31,31	33,68	0	0	0	0	0	0
1	51,83	52,51	49,39	45,94	52,37	49,69	0,3	12,75	5,14	0	1,79	0

ET_relació n	G2			G4			G1			G3		
0,0041	2,13	5,08	6,03	10,71	7,73	6,1	0	0	0	0	1,58	0
0,012	17,55	16,79	16,18	24,96	19,97	18,29	8,54	5,02	14,91	7,75	7,88	5,99
0,037	31,28	29,9	29,89	28,39	28,21	27,88	11,98	11,38	9,98	14,52	12,93	8,95
0,11	30,11	20,83	32,51	29,55	29,13	30,22	1,54	0	0,5	7,33	2,56	6,88
0,33	24,09	24,84	24,58	37,77	34,9	37,91	0	0	4,72	1,67	0	1,78
1	51,67	47,7	48,05	47,12	48,77	45,02	8,09	11,02	11,07	3,49	8,43	7,68

[illegible]

0,012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,037	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	3,37	0	0	1,59	0	0	0	0	0	0

La actividad específica se evaluó adicionalmente midiendo los niveles de citocinas en sobrenadantes de cultivo después de un cocultivo durante la noche de productos de células T con células diana Nalm6, ST486, Raji, Raji CD19KO, Raji CD20KO y K-562 en una relación E:T de 1:1. Se realizó la cuantificación de la producción de citocinas proinflamatorias IFN- γ , IL-2 y factor de necrosis tumoral α (TNF- α).

Las células T CAR anti-CD19/CD20 producidas por un proceso de tres días y los productos de células T CAR anti-CD19/CD20 día 6 mostraron una producción robusta de citocinas proinflamatorias de IFN- γ , IL-2 y TNF- α dependientes de antígenos a partir del cocultivo con las células diana positivas al antígeno, Nalm6, ST486, Raji, Raji CD19KO y Raji CD20KO (**Tabla 22A-22C**). Tanto las células T CAR anti-CD19/CD20 producidas mediante un proceso de tres días como los productos de células T CAR anti-CD19/CD20 del día 6 mostraron niveles de citocinas comparables de IL-2 y TNF- α , en las diversas líneas celulares diana sometidas a pruebas. La funcionalidad de cada CAR individual se demostró mediante la producción de citocinas cuando los productos de células T se cultivaron conjuntamente con células diana que expresaban un único antígeno (Raji CD19KO o Raji CD20KO), aunque a niveles más bajos que los inducidos por el cocultivo con células parentales Raji, que expresan ambos antígenos. Por el contrario, no se detectó producción de citocinas en la ausencia de células diana (es decir, células T solas) y no hubo producción de citocinas a partir de células T CAR cocultivadas con células K-562 (CD19–CD20–) negativas para el antígeno, como se muestra (**Tabla 22A-22C**)

Tabla 22A. Secreción de IFN γ (pg/ml)

	G1			G2		
Raji	631,842023	673,719917	693,715378	88686,8936	88390,2695	95705,4359
Raji CD19KO	492,120724	546,261438	615,66846	56910,7259	61177,0689	64253,8024
Raji CD20KO	513,960957	762,309569	463,0381	80535,1897	85534,1247	73591,69
Nalm6	556,3588	634,7961	846,9493	73772,59	71733,16	83234,62
ST486	859,1064	739,7526	610,4024	102770,7	74682,97	84363,41
K-562	504,6792	427,0096	494,3015	5068,977	5101,474	4395,067
Células T solas	493,22016	439,41505	560,89536	3804,1729	2774,8777	3279,106
	G3			G4		
Raji	64,633201	85,182547	62,767611	72703,3938	62697,5733	73943,3727
Raji CD19KO	50,653482	32,994943	46,00049	45363,4252	43389,0288	45471,0076
Raji CD20KO	59,970116	40,422233	58,25347	52114,3441	54101,4732	56705,47
Nalm6	24,02465	32,34113	21,25442	69690,74	74599,62	72071,31
ST486	54,5489			81068,87	59904,5	66741,56
K-562	112,971583	14,7083822	10,3012139			
Células T solas	15,963588	20,0692	16,993131	61,042722	59,292719	65,083158

Tabla 22B. Secreción de IL-2 (pg/ml)

	G1			G2		
Raji		1,2715598	1,9489383	4272,88282	5156,01144	4736,15664
Raji CD19KO	5,6393266	0,9313962	1,9489383	907,473679	944,985293	1060,583
Raji CD20KO	0,2456634	4,3021465	2,121362	4067,82741	3431,4832	3784,99
Nalm6				3087,476	3506,963	3593,429
ST486		0,02115656	10,4754167	4327,265	3690,72	3809,59

K-562	0	0	0	6,46259237	5,92807962	8,63028699
Células T solas	1,5061941	2,0514315	1,6878284	7,6561311	4,574488	4,848683
	G3			G4		
Raji	4,9712569	13,273517	3,2961473	3020,23907	3257,4112	3424,93298
Raji CD19KO	5,6393266		2,2865335	936,790753	927,019416	1056,80524
Raji CD20KO			5,047304	1720,39506	1631,67487	1711,666
Nalm6	4,722206			1930,181	2080,665	2074,802
ST486				2868,025	2615,041	2629,092
K-562	0	0,40768438	0,06331794	1,39388945	1,59690516	3,24797964
Células T solas	0,7510095	2,2637136	1,5969961	3,3267079	3,2659041	3,9959589

Tabla 22C. Secreción de TNF α (pg/ml)

	G1			G2		
Raji	23,813341	19,161838	20,192636	754,338361	891,841792	751,149696
Raji CD19KO	15,057532	13,018343	16,336655	357,632019	344,056688	461,368626
Raji CD20KO	22,518038	8,7215178	6,306	929,466749	898,546424	844,7008
Nalm6				821,6964	773,5773	844,172
ST486	1,608184	19,8814103	21,0210015	878,2847	793,4574	897,9296
K-562	1,47838933	0,47430105	0	6,70118515	5,88777721	6,81731438
Células T solas	1,8959588	1,6426018	2,7219428	12,654293	10,497499	14,290262
	G3			G4		
Raji	5,9760712	8,7215178	4,9869821	598,931052	475,071069	689,204856
Raji CD19KO	3,7596826	12,256219	10,484037	279,821783	271,683547	347,448925
Raji CD20KO	8,4706165	3,2721687	1,08748	524,274078	594,040007	527,0265
Nalm6				587,2551	614,7329	578,2727
ST486		7,07694449	12,7634852	672,34	647,3185	609,3595

K-562	0,17620014	0	0	1,27235707	1,15449786	0,71149013
Células T solas	1,168786	1,1321249	2,9004278	1,3150979	1,8598301	2,9717291

Para evaluar la proliferación específica del antígeno de los productos de células T CAR tras la interacción con antígenos diana, se recolectaron productos de células T que se habían cocultivado con células diana Raji, Nalm6, Raji CD19KO, Raji CD20KO y K-562 4 días después del inicio del cocultivo, se centrifugó hasta obtener bolitas y se preparó para la evaluación por citometría de flujo. Las células T se habían marcado previamente con un tinte fluorescente usado para rastrear múltiples generaciones de células mediante el análisis de la dilución del tinte tras la división celular. Se usó la relación E:T 1:1 de los cocultivos y los productos de células T que se habían cultivado en la ausencia de células diana (células T solas) se usaron como controles. Se usaron células T cocultivadas con células K-562 (CD19⁻ CD20⁻) negativas al antígeno para evaluar la especificidad y los niveles de proliferación independiente del antígeno, mientras que las células T solas se usaron para evaluar los niveles iniciales de proliferación en la ausencia de estímulos. Tras la recolección, las células se tiñeron con anticuerpos marcados con fluorescencia contra CD3, CD4, CD8, CD19 CAR, CD20 CAR, CD25 y un tinte de viabilidad.

Las células T CAR anti-CD19/CD20 producidas mediante un proceso de tres días y los productos de células T CAR anti-CD19/CD20 del día 6 mostraron una proliferación comparable en cocultivo con células diana Nalm6, Raji, Raji CD19KO y Raji CD20KO, pero no con células K-562 negativas al antígeno, lo que demuestra que tanto el CAR anti-CD19 como el CAR anti-CD20 en los productos de células T son funcionales. Los controles de células T NTD mostraron varios niveles de proliferación inicial inespecífica cuando se cocultivaron con las diferentes líneas celulares diana, pero en general, las células NTD del día 3 demostraron una mayor proliferación inicial que las células NTD del día 6.

Ejemplo 8: Eficacia in vivo de células preparadas mediante un proceso de tres días

Se realizaron estudios *in vivo* en un modelo de ratón con xenoinjerto diseminado de ALL-B humana, que consiste en ratones diabéticos no obesos (NOD, por sus siglas en inglés) con inmunodeficiencia combinada grave (scid) y receptor nulo de cadena gamma (NSG, por sus siglas en inglés) de IL-2 a los que se les inyectó por vía intravenosa células Nalm6-luc, que expresan altos niveles de CD19 y CD20. Se evaluó la eficacia antitumoral para productos de células T CAR que se generaron a partir de células T derivadas de 1 donante sano y se caracterizaron previamente mediante estudios in vitro como se describe en el Ejemplo 7.

Se implantaron células Nalm6luc ($5,0 \times 10^5$) por vía intravenosa mediante la vena lateral de la cola en ratones NSG hembra de 7 semanas de edad (5 ratones por grupo). El día 6 después de la implantación del tumor, los ratones recibieron controles (vehículo [solución salina regulada con fosfato] o células NTD del día 3) o células T CAR anti-CD19/CD20, de la siguiente manera: Células T CAR anti-CD19/CD20 producidas mediante un proceso de tres días en 1 de 3 niveles de dosis (células T CAR⁺ de $2,0 \times 10^5$, $4,0 \times 10^4$ y $8,0 \times 10^3$); producto de células T CAR antiCD19/CD20 del día 6 a 1 nivel de dosis (células T CAR⁺ de $2,0 \times 10^5$). A todos los animales se les administró una única administración IV del tratamiento aplicable en un volumen fijo de 100 µl y los ratones del grupo del vehículo recibieron una inyección IV de 100 µl de PBS. La **Tabla 23** muestra los grupos experimentales para los resultados representados en las **Tablas 24-26**.

Tabla 23. Grupos de experimentos para los resultados presentados en las Tablas 24-26

Grupo	N	Células primarias	CAR+ dosis/kg
G1	5	Vehículo	N/A
G2	5	NTD_D3	$5,0 \times 10^5$ (células T)
G3	5	Anti-CD19/CD20 CAR_D3	$2,0 \times 10^5$

G4	5	Anti-CD19/CD20 CAR_D3	$4,0 \times 10^4$
G5	5	Anti-CD19/CD20 CAR_D3	$8,0 \times 10^3$
G6	5	Anti-CD19/CD20 CAR_D6	$2,0 \times 10^5$

La actividad antitumoral se evaluó mediante la evaluación del cambio en la carga tumoral (medida por bioluminiscencia y $\log_{10}$ normalizado) desde el día 5 (1 día antes de la infusión de células T CAR) hasta el día 22 (es decir, 16 días después de la infusión de células T CAR y el último momento en el que todos los grupos estaban intactos). El tratamiento con células T CAR anti-CD19/CD20 producidas mediante un proceso de tres días resultó en una reducción significativa en la carga tumoral en comparación con ratones que recibieron vehículo (PBS) o células T NTD del día 3 (**Tabla 24**).

10 **Tabla 24. Actividad antitumoral de productos de células T sobre la carga tumoral de ratones NSG portadores de Nalm6-luc (fotones/s)**

Días	G1				
5	1,27E+07	6,11E+06	6,06E+06	4,56E+06	4,53E+06
8	1,28E+08	5,72E+07	6,38E+07	4,31E+07	6,22E+07
12	5,42E+09	4,00E+09	2,38E+09	2,60E+09	2,13E+09
15	1,39E+10	8,68E+09	9,48E+09	9,49E+09	9,04E+09
19	2,23E+10	2,80E+10	8,25E+08	2,86E+10	2,57E+10
22	4,47E+10	4,17E+10	4,59E+10	3,55E+10	3,92E+10
Días	G2				
5	1,23E+07	6,14E+06	5,75E+06	4,71E+06	4,50E+06
8	1,30E+08	5,09E+06	5,66E+07	5,70E+07	4,59E+07
12	6,18E+09	3,42E+09	3,20E+09	2,99E+09	2,62E+09
15	1,56E+10	1,35E+10	1,57E+10	1,60E+10	1,08E+10
19	3,26E+10	2,86E+10	3,02E+10	3,48E+10	3,27E+10
22	4,75E+10	4,82E+10	5,80E+10	6,61E+10	4,67E+10

Días	G3				
5	8,26E+06	6,56E+06	5,62E+06	4,84E+06	4,09E+06
8	9,42E+07	7,78E+07	7,66E+07	8,78E+07	6,56E+07
12	1,18E+08	1,97E+08	1,52E+08	1,50E+08	2,18E+08
15	4,28E+06	4,36E+06	1,10E+07	5,90E+06	1,67E+07
19	7,96E+05	9,64E+05	9,66E+05	7,64E+05	9,74E+05
22	6,41E+05	6,28E+05	7,37E+05	6,58E+05	7,24E+05
26	6,10E+05	7,45E+05	7,47E+05	6,72E+05	7,17E+05
29	6,42E+05	7,91E+05	1,19E+06	8,19E+05	8,23E+05
33	6,40E+05	7,79E+05	1,24E+06	9,26E+05	9,22E+05
36	6,50E+05	8,02E+05	1,43E+06	9,25E+05	8,02E+05
40	6,77E+05	7,81E+05	1,72E+06	8,67E+05	9,19E+05
44	8,32E+05	8,66E+05	3,04E+06	9,40E+05	1,09E+06
48	7,81E+05	8,16E+05	2,33E+06	7,85E+05	9,18E+05
51	8,04E+05	1,27E+06	6,47E+07	3,49E+06	9,71E+05
55	1,72E+06	4,65E+06	4,89E+08	1,60E+07	1,90E+06
58	1,20E+06	3,62E+06	3,83E+08	6,81E+06	1,13E+06
61	1,60E+07	1,31E+08	8,78E+09	2,15E+08	1,48E+07
65	3,97E+07	4,56E+08	1,20E+10	3,29E+08	2,92E+07
Días	G4				
5	8,14E+06	6,59E+06	5,60E+06	5,08E+06	3,67E+06
8	4,50E+06	6,44E+07	8,50E+07	5,81E+07	4,03E+06
12	2,33E+09	2,40E+09	1,86E+09	1,59E+09	1,18E+09
15	3,07E+09	7,27E+09	3,02E+09	2,10E+09	1,48E+09
19	1,02E+06	1,14E+06	8,76E+05	1,07E+06	8,67E+05
22	8,96E+05	9,88E+05	1,02E+06	8,63E+05	6,80E+05
26	6,46E+05	9,76E+05	7,79E+05	6,63E+05	7,98E+05
29	6,71E+05	5,74E+05	6,93E+05	6,35E+05	6,12E+05
33	8,45E+05	1,01E+06	8,17E+05	9,12E+05	8,15E+05
36	8,75E+05	7,00E+05	1,01E+06	8,68E+05	9,22E+05
40	7,64E+05	1,35E+06	1,02E+06	8,80E+05	9,03E+05
44	9,17E+05	1,30E+06	1,07E+06	1,04E+06	9,77E+05
48	8,42E+05	3,24E+06	1,12E+06	1,88E+06	9,78E+05
51	9,25E+05	9,93E+05	1,14E+06	3,96E+06	1,26E+06
55	8,83E+05	5,95E+06	1,17E+06	6,44E+05	7,58E+05

58	1,05E+06	3,07E+06	1,38E+06	1,38E+06	7,95E+05
61	2,14E+06	1,14E+08	5,43E+06	4,49E+06	1,38E+06
65	1,19E+07	1,05E+09	2,37E+07	1,94E+07	2,26E+06
Días	G5				
5	7,75E+06	6,60E+06	5,54E+06	5,14E+06	3,44E+06
8	3,90E+06	7,80E+07	7,16E+07	5,36E+07	2,84E+06
12	4,03E+09	3,73E+09	2,73E+09	2,22E+09	4,23E+09
15	1,41E+10	9,71E+09	1,04E+10	7,87E+09	1,30E+10
19	2,18E+10	1,99E+10	2,18E+10	1,64E+10	2,03E+10
22	2,51E+10	2,78E+10	3,45E+10	1,24E+10	1,84E+10
26	2,21E+10	4,28E+10	4,11E+10	2,01E+10	1,27E+10
29	3,01E+10	4,71E+10	8,67E+10	2,14E+10	9,90E+09
33					2,64E+10
Días	G6				
5	1,03E+07	6,46E+06	5,66E+06	4,81E+06	4,33E+06
8	8,05E+07	4,06E+07	3,95E+07	2,32E+07	1,42E+07
12	3,73E+07	1,94E+06	2,90E+06	3,68E+06	1,52E+06
15	3,21E+06	7,48E+05	7,54E+05	8,15E+05	8,42E+05
19	1,44E+06	1,21E+06	1,45E+06	1,28E+06	1,20E+06
22	2,74E+06	1,40E+06	2,96E+06	2,14E+06	1,31E+06
26	8,18E+06	3,32E+06	1,49E+07	8,39E+06	4,55E+06
29	5,40E+07	2,11E+07	1,39E+08	6,41E+07	3,06E+07
33	1,38E+09	4,60E+08	4,35E+09	1,95E+09	1,32E+09
36	1,07E+10	4,52E+09	1,39E+10	8,28E+09	6,10E+09
40	2,92E+10	1,55E+10	2,61E+10	2,13E+10	1,81E+10
44	2,60E+10	3,51E+10	4,68E+10	4,37E+10	5,06E+10

Se observó inhibición y regresión del crecimiento tumoral en las cohortes de dosis de células T CAR + $2,0 \times 10^5$ (124,3 %) y $4,0 \times 10^4$ (121,1 %) CAR + de células T anti-CD19/CD20 CAR producidas por un proceso de tres días; y con la dosis más baja de células T CAR⁺ de $8,0 \times 10^3$, los ratones mostraron una ligera inhibición del crecimiento tumoral (5,5 %). El crecimiento tumoral se controló en animales que recibieron la dosis de células $2,0 \times 10^5$ células T CAR⁺ de CAR anti-CD19/CD20 el día 6 con una inhibición del

crecimiento tumoral de 112,5 % en comparación con el grupo de vehículo (**Tabla 24, Tabla 25**).

Tabla 25. Análisis de transformación logarítmica de la carga tumoral

5

	G1	G2	G3	G4	G5	G6
Día 5	6,80	6,79	6,76	6,75	6,74	6,78
Día 22	10,62	10,72	5,83	5,94	10,35	6,30
Cambio, día 5 a día 22	3,82	3,93	-0,93	-0,80	3,61	-0,48
DT/DC	100,0 %	102,9 %	-24,3 %	-21,1 %	94,5 %	-12,5 %
Inhibición del crecimiento tumoral, día 22	0,0 %	-2,9 %	124,3 %	121,1 %	5,5 %	112,5 %

10

La carga tumoral (medida por BLI) se normalizó $\log_{10}$, con las medias para cada cohorte en el día 5 y el día 22 del estudio representadas en la **Tabla 25**. Se calculó el cambio en el BLI tumoral del día 5 al día 22, y el cambio porcentual en la carga tumoral con respecto al grupo de vehículo se calculó como DT/DC. La inhibición del crecimiento tumoral se definió como $(1-[DT/DC] \times 100)$ y representó el cambio porcentual del volumen del tumor en los brazos del estudio en relación con el control (es decir, ratones que recibieron vehículo [PBS]). Una TGI de 0 % indica que el crecimiento tumoral medio del grupo fue comparable al crecimiento tumoral medio observado en ratones que recibieron vehículo, mientras que una TGI de 100 % indica que no se observó crecimiento tumoral entre el día 5 y el día 22. Una TGI > 100 % indica que la carga tumoral media retrocedió del día 5 al día 22, mientras que una TGI < 0 indica un aumento de la carga tumoral mayor que el aumento observado en ratones que recibieron vehículo.

15

20

La eficacia antitumoral, determinada mediante el análisis de la carga tumoral, alcanzó significación estadística el día 22 para los ratones tratados con células T CAR anti-CD19/CD20 producidas mediante un proceso de tres días en todas las dosis probadas

(células T CAR⁺ de $2,0 \times 10^5$, $4,0 \times 10^4$, y $8,0 \times 10^3$) y para los ratones tratados con el producto CAR anti-CD19/CD20 del día 6 a células T CAR⁺ de $2,0 \times 10^5$ (**Tabla 26**).

Tabla 26. Análisis estadístico de la carga tumoral, día 22

Grupos de tratamiento	G1	G2	G3	G4	G5	G6
G1		ns	****	****	**	****
G2	ns		****	****	***	****
G3	****	****		ns	****	****
G4	****	****	ns		****	***
G5	**	***	****	****		****
G6	****	****	****	***	****	

En la **Tabla 26**, se evaluó la significancia estadística de los datos de BLI del tumor normalizado Log₁₀ en el día 22 en todos los grupos usando el análisis de varianza con la prueba posterior de Tukey. La importancia entre las comparaciones se observa de la siguiente manera: ns, P > 0,05; **, P < 0,01; ***, P < 0,001; ****, P < 0,0001.

El tratamiento de ratones con células T CAR anti-CD19/CD20 producidas mediante un proceso de tres días o productos de células T CAR anti-CD19/CD20 del día 6 resultó en una mayor supervivencia general (OS, por sus siglas en inglés) en comparación con los ratones que recibieron vehículos o controles NTD. Todos los ratones que recibieron vehículos o controles NTD abandonaron el estudio el día 15 o el día 12, respectivamente, basado en el punto de referencia de supervivencia definido por la carga tumoral $<1 \times 10^{10}$ fotones/segundo de bioluminiscencia. Los grupos tratados con células T CAR anti-CD19/CD20 producidas mediante un proceso de tres días en las dosis más altas de células T CAR⁺ de $2,0 \times 10^5$ y $4,0 \times 10^4$ lograron una supervivencia de 80 % y 100 %, respectivamente, en el punto final del estudio. Los ratones tratados con la dosis más baja de células T CAR anti-CD19/CD20 producidas mediante un proceso de tres días (células T CAR⁺ de $8,0 \times 10^3$) alcanzaron una

mediana de supervivencia de 12 días, similar a la de los ratones de los grupos de control (vehículo y NTD del día 3). Con la misma dosis de células T CAR⁺ de $2,0 \times 10^5$, los ratones que recibieron el producto de células T CAR anti-CD19/CD20 del día 6 tuvieron una mediana de supervivencia reducida (36 días) en comparación con los ratones tratados con células T CAR anti-CD19/CD20 producidas mediante un proceso de tres días (no se alcanzó el punto medio de supervivencia).

En resumen, el tratamiento con células T CAR anti-CD19/CD20 producidas mediante un proceso de tres días retrasó significativamente el crecimiento tumoral y aumentó la supervivencia en un modelo de ratón NSG con xenoinjerto de ALL-B humana Nalm6-luc.

Ejemplo 9: Características fenotípicas adicionales de células fabricadas mediante un proceso de 3 días

Este ejemplo complementa el Ejemplo 3 y presenta datos adicionales relacionados con las características fenotípicas de las células recolectadas fabricadas mediante el proceso de 3 días.

Las tablas 27 y 28 muestran datos del producto final para células preparadas usando el proceso de 3 días. Las células se derivaron de material de donante sano (aféresis fresca o PBMC congeladas; N1-N9) y del material del paciente (PBMC congeladas; P1-P4). Las ejecuciones del producto final presentaron frecuencias más altas de células de memoria central (CM, por sus siglas en inglés) y juveniles en comparación con Teff/TEMRA y poblaciones de células de memoria efectora (EM, por sus siglas en inglés), lo que indica un producto más juvenil (Tablas 27 y 28).

Tabla 27

	Células T CD3+ (%)		Células T CD4+ (%)			
	CD4	CD8	CM	Juvenil	Teff/TEMRA	EM
N1	46,7	49,2	37	56,3	0,29	6,39

N2	49,7	46,8	27,3	63,8	0,89	8,02
N3	32,4	54,1	37,9	53,5	0,6	8,0
N4	66	30,1	44,8	42,9	0,5	11,8
N5	55,7	41,4	52,9	46	0	1
N6	65,1	31,1	37,2	52,8	2,2	7,9
N7	72,9	23,6	56,8	27,2	0,2	15,9
N8	36,3	59,8	58,8	23,8	0,6	16,8
N9	53,5	42,8	24,7	66,3	2,2	6,8
P1	81,6	15,1	58,4	27,3	3,4	10,9
P2	70,8	27,2	53,3	34,3	0,6	11,8
P3	39,5	42,2	84,7	6,2	0,6	8,5
P4	71,2	25,6	84,3	4,1	0,3	11,3

Tabla 28

	Células T CD8+ (%)			
	CM	Juvenil	Teff/TEMRA	EM
N1	67,9	25,6	0,36	6,16
N2	62,2	27,3	2,62	7,9
N3	65,1	19,7	0,7	14,5
N4	54,6	33,1	0,7	11,5
N5	62,5	31,8	3,5	2,
N6	70,5	9,3	4,4	15,8
N7	62,1	19,1	0,7	18,2
N8	81,5	10,6	0,3	7,6
N9	63,0	28,3	0,7	7,9
P1	71,2	3,2	0,8	24,8
P2	45,4	12,9	0,5	41,2
P3	93,3	0,4	0,3	6,0
P4	65,7	3,6	11,6	19,0

- 5 En las Tablas 27 y 28, las abreviaturas son las siguientes: CM, memoria central; EM, memoria efectora; HD, donante saludable; TEMRA, células T de memoria efectora diferenciada terminalmente. Se usaron CD45RA y CCR7 para definir subconjuntos de fenotipos de células

T, que incluyen células T juveniles (vírgenes, CD45RA+CCR7+), CM (CD45RA-CCR7+), EM (CD45RA-CCR7-) y Teff/TEMRA (CD45RA+CCR7-)

Como se observa en la Tabla 27, el porcentaje de células CD4+ CCR7+ (es decir, células CM y juveniles) en el producto final recolectado es al menos 80 % de la población de células T CD4+ recolectada. Dicho de otra manera, el porcentaje máximo de células Teff/TEMRA y EM CD4+ en la población final recolectada es aproximadamente 20 %. Por lo tanto, hay al menos 4 veces más células CD4+ CCR7+ en la población recolectada que células Teff/TEMRA y EM CD4+.

Como se observa en la Tabla 28, el porcentaje de células CD8+ CCR7+ (es decir, células CM y juveniles) en el producto final recolectado es al menos aproximadamente 60 % de la población de células T CD8+ recolectada. Dicho de otra manera, el porcentaje máximo de células Teff/TEMRA y EM CD8+ en la población final recolectada es aproximadamente 40 %. Por lo tanto, hay al menos 1,5 veces más células CD8+ CCR7+ en la población recolectada que células Teff/TEMRA y EM CD8+.

Ejemplo 10: Caracterización de células preparadas mediante un proceso de tres días

Este ejemplo describe la caracterización funcional y fenotípica de las células T CAR anti-CLL-1 que se recolectaron el día 3 en comparación con las células T CAR anti-CLL-1 que se recolectaron el día 8. Las células T CAR anti-CLL-1 descritas en este ejemplo se produjeron mediante un método similar al descrito en el Ejemplo 7.

Brevemente, las células T seleccionadas de un donante humano sano se activaron el día 0 y se transdujeron el día 1 usando un vector lentiviral que codifica un CAR anti-CLL-1. Las células transducidas se recolectaron posteriormente el día 3. Otro conjunto de células T CAR anti-CLL-1 se elaboraron a partir de células T del mismo donante pero se recolectaron el día 8. Posteriormente, ambos productos de células T CAR se caracterizaron funcionalmente y se compararon con sus respectivas células T de control NTD (NTD del día 3 y NTD del día 8).

Los grupos de experimentos para los estudios descritos en este Ejemplo se muestran en la **Tabla 29**.

Tabla 29. Grupos experimentales

5

Grupo	Células primarias
1	CAR anti-CLL-1 del día 3
2	NTD del día 3
3	CAR anti-CLL-1 del día 8
4	NTD del día 8

Se evaluó la expresión en la superficie de las células CAR de las células T CAR anti-CLL-1 recolectadas los días 3 y 8 para establecer las eficiencias de transducción de CAR. La expresión de CAR fue comparable entre los recolectados el día 3 y el día 8. La expresión del CAR anti-CLL-1 fue de 60,4 % para las células T CAR anti-CLL-1 recolectadas el día 3 y de 78,9 % para las células T CAR anti-CLL-1 recolectadas el día 8.

10

La caracterización fenotípica de los productos de células T CAR se realizó mediante citometría de flujo. Las células T CAR anti-CLL-1 recolectadas el día 3 mostraron un mayor perfil de células T juveniles con 83,7 % de células CD45RA⁺CCR7⁺ en el día 3 de recolección en comparación con 23 % de CD45RA⁺CCR7⁺ en el día 8 de recolección.

15

Las células T CAR anti-CLL-1 recolectadas el día 3 mostraron un aumento de células CD4⁺ en comparación con las recolectadas el día 8, como se muestra en la **Tabla 30**.

Tabla 30: Porcentaje de CD4⁺ y CD8⁺

	CD4 ⁺	<u>CD8⁺</u>
G1	85,7	12,1
G2	87,6	10,8
G3	39	59,6
G4	34,5	64,4

20

La funcionalidad de los productos de células T CAR se evaluó en ensayos de cocultivo con células diana positivas para el antígeno. Los productos de células T NTD se incluyeron en los experimentos como controles. La citotoxicidad se midió a 1 día y 4 días después del inicio del cocultivo de los productos de células T. Se usaron relaciones E:T de 1:1 a 1:3. Se usaron las líneas celulares MV4-11 (CLL-1 de expresión media) y Kasumi-1 (CLL-1 de muy baja expresión).

Las células T CAR anti-CLL-1 recolectadas el día 3 mostraron una mayor citotoxicidad *in vitro* contra células Kasumi-1 en comparación con las células T con CAR anti-CLL-1 recolectadas el día 8 (**Tablas 30A-30B**). Las células T CAR anti-CLL-1 recolectadas el día 3 y el día 8 mostraron una citotoxicidad comparable *in vitro* contra células MV4-11 (**Tablas 30C-30D**).

Tabla 30A. Citotoxicidad Kasumi-1 de 24 horas (% de citotoxicidad; n=3)

ET_ relación	G1		G3		G2		G4	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
1:3	31,39755	7,237829	5,72886	0,190338	10,74357	10,65613	-1,74482	1,001606
1:1	31,1249	8,885557	1,456459	2,737722	19,24212	14,33823	-14,8815	2,310444

Tabla 30B. Citotoxicidad Kasumi-1 de 96 horas (% de citotoxicidad; n=3)

ET_ relación	G1		G3		G2		G4	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
1:3	52,72296	5,543031	61,92385	2,352123	16,17232	3,449642	7,881773	1,533963
1:1	71,15299	3,609597			51,42474	4,706712	45,29149	1,63592

Tabla 30C. Citotoxicidad MV4-11 de 24 horas (% de citotoxicidad; n=3)

ET_ relación	G1		G3		G2		G4	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
1:3	50,36574	13,43492	28,20413	0,961508	0,635403	5,109987	-10,2269	1,117845
1:1	62,16195	4,45965	54,16878	0,382472	18,13723	12,05343	-14,0123	1,843203

Tabla 30D. Citotoxicidad MV4-11 de 96 horas (% de citotoxicidad; n=3)

ET_ relación	G1		G3		G2		G4	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
1:3	91,10783	3,76045			19,22778	1,837575	10,31388	1,704941
1:1	89,19031	3,246625	99,74822	0,031169	16,87958	0,044702	13,43041	2,969454

Ejemplo 11: Caracterización adicional de células preparadas mediante un proceso de 3 días

En este ejemplo se informan las características fenotípicas de las células producidas usando un proceso de 3 días similar al descrito en el Ejemplo 3 anterior. En este ejemplo, se usó un vector lentiviral para administrar el CAR.

En primer lugar, como se muestra en la Tabla 31, las células recolectadas generadas a partir del proceso de 3 días tenían una relación CD4/CD8 mayor en comparación con las células recolectadas del proceso de 7 días. La Tabla 31 revela los valores de 4 muestras individuales por grupo identificado.

Tabla 31. Las células generadas a partir del proceso de 3 días tenían una relación CD4/CD8 mayor en comparación con las células recolectadas del proceso de 7 días. (NTD = control no transducido).

Grupo	Muestra	Relación CD4/CD8
<i>Controles de NTD de 3 días (n=4)</i>	1	20,50438596
	2	8,466019417
	3	4,174863388
	4	6,453125
<i>Controles de NTD de 7 días (n=4)</i>	1	3,143459916
	2	1,809798271
	3	1,063965885
	4	2,210702341
<i>Células del día 3 (n=4)</i>	1	12,86956522
	2	7,016949153
	3	4,2
	4	6,373015873
<i>Células del día 7 (n=4)</i>	1	2,590405904
	2	2,105769231
	3	1,023255814
	4	2,022151899

A continuación, como se muestra en la Tabla 32, las células recolectadas generadas a partir del proceso de 3 días tenían porcentajes mayores de células CD45RA+CCR7+ y células CD45RA-CCR7- en comparación con las células recolectadas del proceso de 7 días. La Tabla 32 revela los valores de 4 muestras individuales por grupo identificado. (NTD = control no transducido).

Tabla 32. Las células CD45RA+CCR7+ y las células CD45RA-CCR7- son más abundantes en las células recolectadas del proceso de 3 días.

Grupo	Muestra	Promedio % de células T CD3 vivas	
		Células CD45RA+CCR7+	Células CD45RA-CCR7-
<i>Control de NTD de 3 días (n=4)</i>	1	61,9	33,8
	2	47,1	47,3

	3	69	2,45
	4	32,9	26,7
<i>Control de NTD de 7 días (n=4)</i>	1	36,5	21,4
	2	30,8	25,6
	3	17,8	0,19
	4	5,49	10,2
<i>Células del día 3 (n=4)</i>	1	58	34,3
	2	33,4	55,8
	3	70	3,15
	4	28,9	28
<i>Células del día 7 (n=4)</i>	1	26,9	24,8
	2	20	33,2
	3	16	0,12
	4	3,31	8,81

A continuación, como se muestra en la Tabla 33, las células recolectadas generadas a partir del proceso de 3 días tenían mayores porcentajes de células Tscm (CD27+CD28+CD45RA+CCR7+) en comparación con las células recolectadas del proceso de 7 días. La Tabla 33 revela los valores de 4 muestras individuales por grupo identificado.

Tabla 33. Las células del proceso de 3 días tuvieron mayores porcentajes de células Tscm en comparación con las células recolectadas en el proceso de 7 días

Grupo	Muestra	<i>Promedio % de células T CD3 vivas (CD27+CD28+CD45RA+CCR7+CD62L+)</i>
<i>Controles negativos de 3 días (n=4)</i>	1	54,7
	2	41
	3	49,1
	4	26,2
<i>Controles negativos de 7 días (n=4)</i>	1	25,9
	2	26,5
	3	9,93
	4	2,94

<i>Células del día 3 (n=4)</i>	1	27,5
	2	17,6
	3	26,7
	4	11,9
<i>Células del día 7 (n=4)</i>	1	3,98
	2	6,79
	3	3,94
	4	0,77

Finalmente, como se muestra en la Tabla 34, las células recolectadas generadas a partir del proceso de 3 días tenían porcentajes más bajos de células T terminalmente diferenciadas (CD45RA+CCR7-CD27-CD28-) en comparación con las células recolectadas a partir del proceso de 7 días. La Tabla 34 revela los valores de 4 muestras individuales por grupo identificado.

Tabla 34. Las células del proceso de 3 días tenían porcentajes más bajos de células T terminalmente diferenciadas en comparación con las células recolectadas de un proceso de 7 días.

Grupo	Muestra	Promedio % de células T CD3 vivas (CD45RA+CCR7-CD27-CD28-CD62L-)
<i>Controles negativos de 3 días (n=4)</i>	1	0,068
	2	0,17
	3	0,5
	4	0,32
<i>Controles negativos de 7 días (n=4)</i>	1	0,41
	2	0,33
	3	3,13
	4	0,28
<i>Células del día 3 (n=4)</i>	1	0,28
	2	0,49
	3	1,19

	4	0,58
<i>Células del día 7 (n=4)</i>	1	0,73
	2	0,29
	3	4,08
	4	0,32

Se compararon las características fenotípicas y funcionales de las células T CAR anti-CD19/CD20 producidas mediante un proceso que tiene una etapa de transducción de lentivirus el día 1 o el día 2. En ambos procesos, la selección y activación de las células T se produjo el día 0. La expresión de CAR se midió detectando un anticuerpo CAR anti-CD19. La **Tabla 35** muestra la expresión de CAR de células T transducidas el día 1 y el día 2 en células recolectadas del día 3 al día 8.

Tabla 35: Porcentaje de células T CD3 con expresión CAR+

	Transducción en el día 1	Transducción en el día 2
Recolección del día 3	57,7	48,6
Recolección del día 4	63,2	48,3
Recolección del día 6	80,3	53,1
Recolección del día 8	77,3	45,2

Se midió la subpoblación de células T de CD27+CD28+CD45RA+CCR7+CD62L+ para determinar las células T CAR anti-CD19/CD20 transducidas el día 1 y el día 2. La **Tabla 36** muestra el porcentaje de células T CAR+ juveniles producidas por cada método.

Tabla 36: Porcentaje de CD27+CD28+CD45RA+CCR7+CD62L+ en células CAR+

	Transducción en el día 1	Transducción en el día 2
Recolección del día 0	52,5	52,5
Recolección del día 3	46,9	43,6

Recolección del día 4	24,9	23,8
Recolección del día 6	14,4	22,5
Recolección del día 8	15,6	23,8

Las muestras del día 0 en la Tabla 36 eran células T totales.

Se compararon ensayos funcionales de citotoxicidad en células T CAR anti-CD19/CD20 transducidas el día 1 (T-D1) o el día 2 (T-D2). La **Tabla 37** muestra los resultados de ensayos de citotoxicidad de 24 horas que tienen una E:T de 1:3 en tres líneas celulares diana (Nalm 6 WT, Raji WT y Nalm 6 CD19 KO) en los días de recolección 3, 4, 6 y 8 (H-D3, H-D4, H-D6 y H-D8, respectivamente).

Tabla 37: Ensayo de citotoxicidad de 24 horas (% de destrucción), E:T = 1:3

	Nalm6 WT		Raji WT		Nalm6 CD19 KO	
	T-D1	T-D2	T-D1	T-D2	T-D1	T-D2
H-D3	72,9	70,0	41,6	41,2	12,6	6,9
H-D4	65,9	60,9	36,3	29,2	2,9	-3,5
H-D6	75,7	72,0	48,4	49,6	-9,0	-11,0
H-D8	87,3	77,5	61,3	48,4	1,6	-7,7

* * *

Si bien se ha descrito un número de modalidades, es evidente que la descripción y los ejemplos pueden proporcionar otras modalidades que usan o están abarcadas por las composiciones y los métodos descritos en la presente. Por lo tanto, se apreciará que el alcance se definirá por lo que se puede entenderse a partir de la descripción y las reivindicaciones adjuntas en lugar de las modalidades que se han representado a manera de ejemplo.