

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar linfocitos transducidos, que comprende
incubar una muestra que comprende linfocitos, obtenida de un sujeto donante,
5 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.
2. El método de la reivindicación 1, en donde los linfocitos transducidos se cultivan durante
10 menos de 48 horas antes de ser recolectados.
3. El método de la reivindicación 1, en donde los linfocitos transducidos se cultivan durante menos de 36 horas antes de ser recolectados.
4. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde la incubación se realiza en un sistema cerrado.
- 15 5. El método de la reivindicación 4, en donde el sistema cerrado tiene un área de superficie interna de al menos 1500 cm².
6. El método de la reivindicación 4 o 5, en donde el sistema cerrado tiene una superficie interna recubierta con una fibronectina humana recombinante, en donde el recubrimiento se realiza con una solución que comprende aproximadamente 1-
20 10 µg/ml de fibronectina humana recombinante.
7. El método de la reivindicación 6, en donde 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.
8. El método de la reivindicación 7, en donde el recubrimiento comprende además un
25 drenaje de la segunda solución.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en donde la muestra en el sistema cerrado comprende al menos $1,5 \times 10^8$ linfocitos.

10. El método de la reivindicación 8, en donde la muestra comprende al menos 4×10^8 linfocitos.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde los linfocitos son células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o células T.
- 5 12. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde la muestra recolectada comprende células CD3+.
13. El método de la reivindicación 12, en donde la muestra recolectada comprende células T CD4+ y CD8+.
14. El método de la reivindicación 13, en donde al menos 20 % de las células T CD4+ son células T vírgenes, y no más de 12 % de las células T CD4+ son células T de memoria efectora.
- 10 15. El método de la reivindicación 14, en donde al menos 25 % de las células T CD4+ son células T vírgenes, y no más de 9 % de las células T CD4+ son células T de memoria efectora.
- 15 16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en donde al menos 10 % de las células T CD8+ son células T vírgenes, y no más de 30 % de las células T CD8+ son células T de memoria efectora.
17. El método de la reivindicación 16, en donde al menos 20 % de las células T CD8+ son células T vírgenes, y no más de 20 % de las células T CD8+ son células T de memoria efectora.
- 20 18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, en donde las células T vírgenes se caracterizan como CCR7+ y CD45RA+.
19. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18, en donde las células T de memoria efectora se caracterizan como CCR7-, CD45RO+ y CD95+.
- 25 20. El método de la reivindicación 13, en donde al menos 80 % de las células T CD4+ son células CCR7+.

21. El método de la reivindicación 13, en donde al menos 60 % de las células T CD8+ son células CCR7+.
22. El método de la reivindicación 13, en donde como máximo 20 % de las células T CD4+ son una combinación de células T de memoria efectora y células T efectoras.
23. El método de la reivindicación 13, en donde como máximo 40 % de las células T CD8+ son una combinación de células T de memoria efectora y células T efectoras.
24. El método de cualquier reivindicación anterior, que comprende además adquirir los linfocitos del sujeto donante o enriquecer los linfocitos.
25. El método de cualquier reivindicación anterior, que comprende además poner en contacto la muestra con un agente estimulante de linfocitos para activar los linfocitos.
26. El método de la reivindicación 25, en donde la activación de la muestra es antes de incubar la muestra con el vector polinucleotídico.
27. El método de la reivindicación 26, en donde la muestra comprende al menos 1×10^9 linfocitos.
28. El método de la reivindicación 25, en donde la activación de la muestra es después de que la muestra se incuba con el vector polinucleotídico.
29. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 28, en donde el agente estimulante de linfocitos comprende un anticuerpo anti-CD3 y/o un anticuerpo anti-CD28.
30. El método de cualquier reivindicación anterior, que comprende además, después de la recolección, administrar los linfocitos recolectados a un sujeto o congelar los linfocitos recolectados.
31. El método de la reivindicación 30, en donde el sujeto es el mismo que el sujeto donante.
32. El método de la reivindicación 30 o 31, en donde se administra al sujeto un total de 10.000 a 1.000.000 de linfocitos recolectados por kilogramo del sujeto.

33. El método de la reivindicación 28, en donde se administra al sujeto un total de 20.000 a 400.000 linfocitos recolectados por kilogramo del sujeto.
34. El método de la reivindicación 28 o 29, en donde al menos 15 % de los linfocitos recolectados se transducen con el vector.
- 5 35. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde el vector polinucleotídico es un vector viral.
36. El método de la reivindicación 31, en donde el vector viral es un vector retroviral o un vector lentiviral.
37. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde el vector codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) o un receptor de células T (TCR).
- 10 38. El método de la reivindicación 34, en donde el CAR comprende un dominio coestimulador intracelular.
39. El método de la reivindicación 35, en donde 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), 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), receptores de células NK de activación, BTLA, un receptor de ligando Toll, CDS, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, 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
- 15
- 20
- 25

(RANKL), DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), 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
 5 ligando que se une específicamente a CD83, y combinaciones de estos.

40. El método de la reivindicación 39, en donde el dominio coestimulador intracelular es una región de señalización de CD28.

41. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 37 a 39, en donde el CAR reconoce un antígeno tumoral.

10 42. El método de la reivindicación 41, en donde el antígeno tumoral es CD19, CD20, y/o CLL-1.

43. El método de la reivindicación 40, en donde el linfocito que comprende el CAR es axicabtagén ciloleucel o brexucabtagén autoleucel.

15 44. Una población de células preparada 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+ son células T vírgenes, y no más de 12 % de las células T CD4+ son células T de memoria efectora;

al menos 10 % de las células T CD8+ son células T vírgenes, y no más de 30 % de las células T CD8+ son células T de memoria efectora;

20 al menos 50 % de las células 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.

45. La población de la reivindicación 44, en donde al menos 25 % de las células T CD4+ son células T vírgenes, y no más de 9 % de las células T CD4+ son células T de memoria efectora.
 25

46. La población de la reivindicación 44 o 45, en donde al menos 20 % de las células T CD8+ son células T vírgenes, y no más de 20 % de las células T CD8+ son células T de memoria efectora.
47. La población de una cualquiera de las reivindicaciones 44 a 46, en donde las células T vírgenes se caracterizan como CCR7+ y CD45RA+.
48. La población de una cualquiera de las reivindicaciones 44 a 47, en donde las células T de memoria efectora se caracterizan como CCR7-, CD45RO+ y CD95+.
49. La población de una cualquiera de las reivindicaciones 44 a 48, en donde al menos 65 % de las células son células T CD3+.
50. La población de una cualquiera de las reivindicaciones 44 a 49, en donde al menos 15 % de todas las células T se transducen con el vector polinucleotídico.
51. La población de una cualquiera de las reivindicaciones 44 a 49, en donde el vector polinucleotídico es un vector viral.
52. La población de la reivindicación 49, en donde el vector viral es un vector retroviral o un vector lentiviral.
53. La población de una cualquiera de las reivindicaciones 44 a 52, en donde el CAR comprende un dominio coestimulador intracelular.
54. La población de la reivindicación 53, en donde el dominio coestimulador intracelular es una región de señalización de CD28.
55. La población de una cualquiera de las reivindicaciones 44 a 54, en donde el CAR reconoce un antígeno tumoral.
56. La población de la reivindicación 55, en donde el antígeno tumoral es CD19 o CD20.
57. La población de la reivindicación 54, en donde la población de células que comprende el CAR son axicabtagén ciloleucel o brexucabtagén autoleucel.
58. Una población de células preparada 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 células T efectoras.

59. Una composición farmacéutica que comprende la población de células de cualquiera de las reivindicaciones 44 a 58.

60. Un método para administrar células T a un sujeto, que comprende inyectar al sujeto una muestra recolectada preparada mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 43, o la composición farmacéutica de la reivindicación 59.

61. El método de la reivindicación 60, en donde el sujeto tiene cáncer.

62. El método de la reivindicación 60, en donde el cáncer es una neoplasia maligna de células B.

63. El método de la reivindicación 61, en donde el cáncer es linfomas no hodgkiniano (NHL), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma linfocítico pequeño (SLL/CLL), linfoma de células del manto (MCL), linfoma folicular (FL), linfoma de zona marginal (MZL), 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.