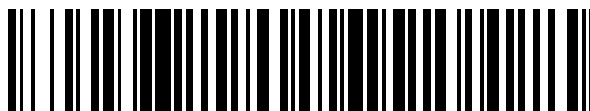


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 260**

51 Int. Cl.:

A61K 35/17	(2015.01)
C12M 1/00	(2006.01)
G01N 33/569	(2006.01)
A61K 35/12	(2015.01)
C12N 5/0781	(2010.01)
C12N 5/0783	(2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.04.2015 PCT/US2015/027401**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.10.2015 WO15164675**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.2015 E 15721094 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2019 EP 3134514**

54 Título: **Métodos para aislar, cultivar y modificar genéticamente poblaciones de células inmunes para la terapia adoptiva**

30 Prioridad:

23.04.2014 US 201461983415 P

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

08.05.2020

73 Titular/es:

**JUNO THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
400 Dexter Avenue North, Suite 1200
Seattle, WA 98109-4703, US**

72 Inventor/es:

**RAMSBORG, CHRIS;
BONYHADI, MARK, L.;
CHAN, CALVIN y
BEAUCHESNE, PASCAL**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 759 260 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para aislar, cultivar y modificar genéticamente poblaciones de células inmunes para la terapia adoptiva

5 **[0001]** La presente solicitud se presenta junto con una lista de secuencias en formato electrónico. El Listado de secuencias se proporciona como un archivo titulado 735042000240seqlist.txt, creado el 22 de abril de 2015, que tiene un tamaño de 13 kilobytes.

Campo

10 **[0002]** La presente descripción se refiere en algunos aspectos a métodos, células y composiciones para preparar células, y composiciones para ingeniería genética y terapia celular. En algunas realizaciones se proporcionan métodos de preparación celular simplificados, p. ej., para aislamiento, procesamiento, incubación e ingeniería genética de células y poblaciones de células. También se proporcionan células y composiciones producidas por los métodos y métodos de su uso. Las células pueden incluir inmunes células, como las células T, y generalmente incluyen una pluralidad de poblaciones de células T aisladas o subtipos de células T. En algunos aspectos, los métodos son capaces de preparar una pluralidad de poblaciones celulares diferentes para la terapia adoptiva usando menos pasos y/o recursos y/o manejo reducido en comparación con otros métodos.

Antecedentes

20 **[0003]** Existen varios métodos disponibles para preparar células para uso terapéutico. Por ejemplo, hay métodos disponibles para aislar, procesar y diseñar células, incluidas las células T y otras células inmunes. Hay métodos disponibles para aislar tales células y para expresar receptores de antígenos genéticamente modificados, como los receptores de células T de alta afinidad (TCR) y receptores de antígeno quimérico (CAR). Hay métodos disponibles para transferir de manera adoptiva dichas células a los sujetos. Se necesitan métodos mejorados para la preparación (p. ej., aislamiento, procesamiento, cultivo e ingeniería) de células para su uso en terapia celular. En particular, se necesitan métodos para la preparación e ingeniería de las células, p. ej., una pluralidad de tipos o subtipos de células aisladas, con eficiencia, seguridad, variabilidad y conservación de recursos mejorados. Se proporcionan métodos, células, composiciones, kits y sistemas que satisfacen tales necesidades.

Resumen

35 **[0004]** La invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas. Se proporcionan métodos para la preparación e ingeniería de células y poblaciones de células y células y composiciones producidas por los métodos. En algunos métodos, las células pueden usarse para inmunoterapia, como en relación con los métodos de inmunoterapia adoptiva. En algunos aspectos, los métodos proporcionados incluyen aislamiento, selección o enriquecimiento de células CD4⁺ y CD8⁺, o subpoblaciones de las mismas, de la misma muestra inicial, como una muestra única, p. ej., una muestra de aféresis, muestra de leucaféresis o una muestra que contiene células mononucleares de sangre periférica (PBMC).
40 Los métodos pueden incluir la selección o el enriquecimiento de al menos dos poblaciones de células, como una población de células CD4⁺ y una población de CD8⁺, en una sola secuencia de procesamiento en donde no se descarta una muestra de fracción negativa de una primera selección o enriquecimiento de uno de los CD4⁺ o CD8⁺ en el proceso, antes de realizar la segunda selección para la otra de las células CD4⁺ o CD8⁺. En algunos métodos, la primera y segunda selección pueden ocurrir simultáneamente o secuencialmente.

45 **[0005]** En algunos aspectos, la selección, el enriquecimiento y/o el aislamiento de ambas poblaciones de células, tales como células CD4⁺ y CD8⁺, se realiza simultáneamente, tal como en el mismo recipiente o utilizando el mismo aparato, o secuencialmente como parte de un sistema o aparato en donde los recipientes, p. ej., columnas, cámaras, utilizadas para realizar la primera y segunda selección, están operativamente conectadas. En algunos métodos, los enriquecimientos o selecciones simultáneas y/o secuenciales pueden ocurrir como un flujo de proceso único sin manejar ninguna de las fracciones positivas o negativas preparadas como parte de la primera y/o segunda selección o enriquecimiento. En algunos aspectos, el aislamiento, el cultivo y/o la ingeniería de las diferentes poblaciones se lleva a cabo a partir de la misma composición o material de partida, como la misma muestra.

55 **[0006]** Los métodos pueden incluir la realización de una primera selección por enriquecimiento a partir de una muestra que contiene células T humanas primarias una de células CD4⁺ o CD8⁺ para generar una primera población seleccionada y una población no seleccionada, y de la población no seleccionada la realización de una segunda selección enriqueciendo para la otra célula CD4⁺ o célula CD8⁺, en donde el método produce una composición de células que contienen células enriquecidas para células CD4⁺ y células enriquecidas para CD8⁺.

60 **[0007]** En algunos métodos, la segunda selección se lleva a cabo mediante el enriquecimiento para el otro de los subtipos de células T de la población no seleccionada generada por la primera selección. Por lo tanto, los métodos proporcionados pueden diferir de otros métodos de selección en que la fracción negativa de una primera selección no se descarta sino que se usa como la base para una selección adicional para enriquecer otro tipo de célula. En general, cuando el subconjunto de células T enriquecido en la primera selección es un subconjunto CD4⁺ (o donde la primera selección enriquece para las células CD4⁺), se deducirá que la primera selección está diseñada de manera que no se
65

enriquezca para las células del otro subtipo para enriquecer en la segunda selección. Por ejemplo, en algunos métodos, la primera selección enriquece las células CD4⁺ y no enriquece las células CD8⁺, y la segunda selección enriquece las células CD8⁺ de la fracción negativa recuperada de la primera selección. Del mismo modo, en general, cuando el subconjunto de células T enriquecido en la primera selección es un subconjunto CD8⁺ (o donde la primera selección enriquece para las células CD8⁺), se deducirá que la primera selección está diseñada de tal manera que no enriquece las células del otro subtipo para enriquecerse en la segunda selección. Por ejemplo, en algunos métodos, la primera selección enriquece las células CD8⁺ y no enriquece las células CD4⁺, y la segunda selección enriquece las células CD4⁺ de la fracción negativa recuperada de la primera selección.

[0008] Los métodos pueden implicar además una tercera, cuarta y otras selecciones adicionales, que pueden enriquecer las células de las poblaciones seleccionadas y/o no seleccionadas de cualquier etapa de selección previa. Por ejemplo, en algunos métodos, las células de la población seleccionada o de la población no seleccionada de un paso dado (p. ej., el segundo paso de selección, se enriquecen aún más. Por ejemplo, en algunos métodos, las células CD8⁺ seleccionadas se enriquecen aún más para un subtipo de células CD8⁺, tales como células en reposo o células de memoria central.

[0009] También se describe en el presente documento un método para producir células T genéticamente modificadas, que comprende (a) proporcionar una composición de iniciación de cultivo, realizando dicha composición producida una primera selección en un sistema cerrado, comprendiendo dicha primera selección el enriquecimiento de una de las células CD4⁺ y células CD8⁺ de una muestra que contiene células T humanas primarias, generando así una primera población seleccionada y una población no seleccionada, y realizando una segunda selección en el sistema cerrado, comprendiendo dicha segunda selección enriquecer la otra de las células CD4⁺ y las células CD8⁺ de la población no seleccionada, generando así una segunda población seleccionada; (b) incubar una composición de cultivo inicial, que comprende células de la primera población seleccionada y células de la segunda población seleccionada, en un recipiente de cultivo en condiciones estimulantes, generando así células estimuladas; y (d) introducir un receptor de antígeno modificado genéticamente en células estimuladas generadas en (b), en donde el método genera así una composición de salida que comprende células T CD4⁺ y CD8⁺ que expresan el receptor de antígeno modificado genéticamente.

[0010] También se proporcionan métodos que incluyen un enriquecimiento o selección simultánea de una primera y segunda población de células, tales como una población de células CD4⁺ y CD8⁺. El método puede incluir poner en contacto las células de una muestra que contiene células T humanas primarias con un primer reactivo de inmunofinidad que se une específicamente a CD4 y un segundo reactivo de inmunofinidad que se une específicamente a CD8 en una composición de incubación, en condiciones en las que los reactivos de inmunofinidad se unen específicamente a CD4 y moléculas de CD8, respectivamente, en la superficie de las células en la muestra, y recuperando las células unidas al primer y/o segundo reactivo de inmunofinidad, generando así una composición enriquecida que comprende células CD4⁺ y células CD8⁺. Los métodos pueden realizarse para incluir en la composición de incubación una concentración del primer y/o segundo reactivo de inmunofinidad que está a una concentración de rendimiento por debajo del óptimo para que la composición enriquecida contenga menos de 70%, menos de 60%, menos de 50%, menos de 40%, menos de 30%, menos del 20% o menos del total de células CD4⁺ en la composición de incubación o menos del 70% menos del 60%, menos del 50%, menos del 40%, menos del 30%, menos del 20% o menos de las células CD8⁺ en la composición de incubación.

[0011] También se proporciona un método para enriquecer células T CD4⁺ y CD8⁺, que comprende proporcionar una composición enriquecida de células T CD4⁺ y + células CD9+, siendo dicha composición enriquecida producida poniendo en contacto las células de una muestra que contiene células primarias T humanas con un primer reactivo de inmunofinidad que específicamente se une a CD4 y un segundo reactivo de inmunofinidad que se une específicamente a CD8 en una composición de incubación, en condiciones por las cuales los reactivos de inmunofinidad se unen específicamente a moléculas de CD4 y CD8, respectivamente, en la superficie de las células en la muestra; y recuperar células unidas al primer y/o segundo reactivo de inmunofinidad, generando así una composición enriquecida que comprende células CD4⁺ y células CD8⁺ en una relación iniciadora de cultivo, en donde: el primer y/o segundo reactivo de inmunofinidad están presentes en la composición de incubación en una concentración de rendimiento subóptima, por lo que la composición enriquecida contiene menos del 70% de las células CD4⁺ totales en la composición de incubación y/o menos del 70% de las células CD8⁺ en la composición de incubación, produciendo así una composición enriquecida para las células T CD4⁺ y CD8⁺.

[0012] El método se puede realizar mediante la selección basada en inmunofinidad, tales como poniendo en contacto células con un anticuerpo que se une específicamente a un marcador de superficie celular, tales como CD4, CD8 o cualquier otro marcador de superficie celular, tal como se expresa en células T ingenuas, en reposo o central de memoria. En algunos métodos, el soporte sólido es una esfera, como una perla, como una microperla o nanopera. En algunos métodos, la perla puede ser una perla magnética. En algunas realizaciones, el soporte sólido puede ser una columna u otro recipiente para efectuar la cromatografía en columna.

[0013] En algunos procedimientos, el anticuerpo contiene una o más parejas de unión capaces de formar un enlace reversible con un reactivo de unión inmovilizado en la superficie sólida, tal como una matriz esfera o cromatografía, en donde el anticuerpo está reversiblemente movilizado a la superficie sólida. En algunos métodos, las células que

expresan un marcador de la superficie celular unida por el anticuerpo en dicha superficie sólida pueden recuperarse de la matriz mediante la interrupción de la unión reversible entre el reactivo de unión y el par de unión. En algunos métodos, el reactivo de unión es estreptavidina o es un análogo o mutante de estreptavidina, como una estreptavidina, un análogo o un mutante establecido en cualquiera de las SEQ ID NO:11-16 o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia a la secuencia establecida en cualquiera de las SEQ ID NOS:11-16 y conserva la unión a un par de unión, como biotina o péptido. En algunos métodos, el par de unión es biotina, un análogo de biotina o un péptido capaz de unirse al reactivo de unión. En algunos métodos, el par de unión es o contiene un péptido capaz de unirse al reactivo de unión, tal como un péptido de unión a estreptavidina, tal como un péptido que contiene la secuencia establecida en cualquiera de las SEQ ID NO:1-10. Después de poner en contacto las células de la muestra con el soporte sólido que contiene el anticuerpo inmovilizado sobre el mismo como parte de la primera y/o segunda selección, los métodos pueden incluir la aplicación de un reactivo de competencia para interrumpir el enlace entre el par de unión y el reactivo de unión, recuperando así las células seleccionadas de la superficie sólida. En algunos métodos, el reactivo de competición es biotina o análogo de biotina.

[0014] Los métodos pueden generar una composición seleccionada o enriquecida que contiene células CD4⁺ a células CD8⁺ seleccionadas o se enriquecidas, o sub-poblaciones de las mismas, presentes en una relación de inicio de cultivo. En algunos métodos, la relación de iniciación del cultivo de células CD4⁺ a CD8⁺ está entre aproximadamente 10:1 y aproximadamente 1:10, entre aproximadamente 5:1 y aproximadamente 1:5 o está entre aproximadamente 2:1 y alrededor de 1:2, como en 1 o alrededor de 1:1. Está dentro del nivel de un experto en la técnica elegir o seleccionar una cantidad suficiente o una cantidad relativa suficiente de reactivo en base a la inmunoafinidad, tales como perlas recubiertas de anticuerpos (p. ej., perlas magnéticas) o una matriz de cromatografía de afinidad o matrices, para lograr o producir una relación de iniciación de cultivo en la composición generada, tal como composición de iniciación de cultivo, que contiene células enriquecidas o seleccionadas para CD4, CD8 o subpoblaciones de las mismas. Ejemplos de tales métodos se describen en las subsecciones a continuación.

[0015] En algunos métodos, las células incluyen las células del sistema inmune, tales como linfocitos, p. ej., células T (p. ej., células CD4⁺ y CD8⁺ y subpoblaciones aisladas de las mismas), y células NK. En algunos métodos, las células están presentes en combinaciones de múltiples poblaciones celulares o tipos de células, que en algunos aspectos se incluyen en las composiciones en proporciones o números particulares de las células o tipos de células. También se proporcionan métodos para optimizar los métodos, tales como seleccionando o determinando proporciones y números apropiados, tales como proporciones iniciadoras de cultivo y proporciones y dosis de salida deseadas, de los tipos de células y la población, para usar en conexión con los métodos.

[0016] También se proporcionan células, poblaciones de células y composiciones de las mismas, para uso y producción por los métodos. También se proporcionan sistemas, dispositivos, aparatos, reactivos, compuestos y kits para llevar a cabo los métodos. También se proporcionan métodos terapéuticos y usos para células y composiciones producidas por los métodos, tales como métodos para terapia celular adoptiva.

[0017] También se proporcionan procedimientos para la producción de células para la terapia celular adoptiva, métodos para producir células para la genética de ingeniería, y métodos para producir células modificadas genéticamente. En algunos aspectos, las células son células T, tales como células T CD4⁺ y CD8⁺ y/o subtipos de las mismas. En algunos aspectos, la terapia celular es la terapia con células T.

[0018] Algunos de los métodos se llevan a cabo por (a) aislar poblaciones de células de una muestra, e (b) incubar una composición iniciadora de cultivo en un recipiente de cultivo que contiene células de las poblaciones aisladas. En algunos aspectos, los métodos incluyen además la ingeniería genética de las células incubadas o las células en el recipiente de cultivo, tal como mediante (c) la introducción de un receptor de antígeno genéticamente modificado en las células en el recipiente de cultivo.

[0019] Algunos de los métodos se llevan a cabo por (a) incubar una composición iniciadora de cultivo en un recipiente de cultivo que contiene una pluralidad de poblaciones de células en una relación de iniciación de cultivo particular o número particular de células; y (b) diseñar genéticamente las células, tal como mediante la introducción de un receptor de antígeno genéticamente modificado en las células en el recipiente de cultivo.

[0020] En algunos métodos, el receptor de antígeno por ingeniería genética se introduce en las células en el recipiente de cultivo, tal como a diferentes tipos de células o subpoblaciones dentro del recipiente de cultivo, p. ej., a células CD4⁺ y CD8⁺ en el recipiente de cultivo.

[0021] En algunos aspectos, los métodos producen una composición de salida para la ingeniería genética o terapia celular adoptiva o que comprenden células que expresan el receptor de antígeno por ingeniería genética.

[0022] En algunos métodos, el aislamiento incluye o se lleva a cabo mediante el aislamiento de una población de células T CD4⁺ primarias humanas y/o una población de células T CD8⁺ primarias humanas de la muestra. En algunos aspectos, incluye agotar o enriquecer para una subpoblación de células CD4⁺, y/o agotar o enriquecer para una subpoblación de células CD8⁺. Así, en algunos aspectos, la composición iniciadora del cultivo incluye células T

primarias humanas CD4⁺ y CD8⁺ aisladas.

[0023] En algunos aspectos, el enriquecimiento o agotamiento se lleva a cabo mediante la selección basada en la inmunofinidad, tal como la unión a anticuerpos u otras moléculas de unión que reconocen marcadores de superficie sobre las células. En algunos aspectos, el anticuerpo u otra molécula está acoplada a una partícula magnética o magnéticamente sensible, p. ej., una perla. En algunos aspectos, la selección incluye pasos de selección positivos y/o negativos.

[0024] En algunos métodos, el aislamiento de la población de células T CD8⁺ primaria humana comprende agotamiento o enriquecimiento para una sub-población de células CD8⁺. En algunos métodos, el aislamiento de la población de células T humanas primarias CD4⁺ comprende agotar o enriquecer una subpoblación de células CD4⁺. En algunos aspectos, el aislamiento de una población de células T comprende el enriquecimiento de las células T_{CM}. En algunos aspectos, el aislamiento de la población de células T humanas primarias CD8⁺ y/o CD4⁺ comprende el enriquecimiento de las células T (T_{CM}) de memoria central. En algunos aspectos, el enriquecimiento para las células T de memoria central (T_{CM}) comprende una selección negativa para las células que expresan un marcador de superficie presente en las células T ingenuas, como CD45RA, o la selección positiva para las células que expresan un marcador de superficie presente en las células T de memoria central y no presente en células T ingenuas, como CD45RO; y/o selección positiva para células que expresan marcadores de superficie presentes en células T (T_{CM}) de memoria central y no presentes en otra subpoblación de células T de memoria, tales como CD62L, CCR7, CD27, CD127 y/o CD44.

[0025] En algunos métodos, el aislamiento incluye (I) someter la muestra a la selección positiva basada en la expresión en superficie de CD4, lo que resulta en una fracción positiva y primera negativa, donde la fracción positiva es la población CD4⁺ aislada; y (II) someter la primera fracción negativa a una selección negativa basada en la expresión de superficie de un marcador de células no T y un marcador de superficie presente en células T ingenuas, generando así una segunda fracción negativa; y (III) someter la segunda fracción negativa a una selección positiva basada en la expresión superficial de un marcador presente en la superficie de las células T (T_{CM}) de memoria central y no presente en la superficie de otra subpoblación de células T de memoria.

[0026] En algunos aspectos, el marcador presente en las células T ingenuas incluye CD45RA. En algunos aspectos, el marcador de superficie presente en las células T (T_{CM}) de memoria central y no presente en otra subpoblación de células T de memoria incluye CD62L, CCR7, CD27, CD127 y/o CD44.

[0027] En algunos aspectos, el aislamiento o selecciones se llevan a cabo en el mismo recipiente de separación. En algunos aspectos, el aislamiento comprende (I) someter la muestra a una primera selección, generando así una de las poblaciones de células T CD4⁺ y CD8⁺ humanas primarias y una muestra no seleccionada; y (II) someter la muestra no seleccionada a una segunda selección, generando así la otra de las poblaciones de células T CD4⁺ y CD8⁺ humanas primarias. En algunos aspectos, la población de células T humanas primarias CD4⁺ se genera en la primera selección y la población de células T humanas primarias CD8⁺ se genera en la segunda selección. En algunos aspectos, la primera y/o segunda selección comprende una pluralidad de pasos de selección positiva o negativa.

[0028] En algunos aspectos, el aislamiento de una o más de las poblaciones, como la población primaria humana de células T, la población de células T CD4⁺ humanas primarias, o la población de células T CD8⁺ primarias humanas, incluye la selección positiva basada en la expresión de superficie CD62L, CCR7, CD44 o CD27. En algunos aspectos, el aislamiento de una o más de las poblaciones, como la población de células T humanas primarias, la población de células T CD4⁺ humanas primarias o la población de células T CD8⁺ humanas primarias, incluye una selección negativa basada en la expresión superficial de CD45RA o selección positiva basada en la expresión de superficie de CD45RO.

[0029] En algunos métodos, los diversos aislamientos, como el aislamiento de la pluralidad de poblaciones de células, p. ej., el poblaciones CD4⁺ y CD8⁺, se llevan a cabo en el mismo recipiente de separación. En algunos aspectos, el recipiente de separación es o incluye un tubo, conjunto de tubos, cámara, unidad, pozo, recipiente de cultivo, bolsa y/o columna. En algunos aspectos, el recipiente de separación mantiene las células en un ambiente contenido o estéril durante la separación.

[0030] En algunos métodos, la incubación se lleva a cabo en condiciones estimulantes. En algunos aspectos, la composición iniciadora del cultivo comprende las poblaciones de células T CD4⁺ y CD8⁺ humanas primarias en una relación iniciadora del cultivo. En algunos aspectos, la relación de iniciación de cultivo está diseñada para producir una relación de salida deseada de células CD4⁺ a CD8⁺ (o el número total deseado de células T o número(s) de la(s) subpoblación(s) después de dicha incubación, o en algún momento posterior, como seguir la ingeniería, la criopreservación, o en el momento justo antes de la administración, como al descongelar al lado de la cama.

[0031] En algunos métodos, la relación de salida deseada es de entre o aproximadamente 5:1 y en o alrededor de 1:5 (o mayor que aproximadamente 1:5 y menos de aproximadamente 5:1), tal como entre en, o aproximadamente 1:3 y aproximadamente 3:1 (o mayor que aproximadamente 1:3 y menor que aproximadamente 3:1), como entre aproximadamente 2:1 y aproximadamente 1:5 (o mayor que aproximadamente 1:5 y menor que aproximadamente 2:1), o es el rango entre aproximadamente 2:1 y aproximadamente 1:5. En algunos aspectos, la relación de salida

deseada es aproximadamente 3:1, 2,9:1, 2,8:1, 2,7:1, 2,6:1, 2,5:1, 2,4:1, 2,3:1, 2,2:1, 2,1:1, 2:1, 1,9:1, 1,8:1, 1,7:1, 1,6:1, 1,5:1, 1,4:1, 1,3:1, 1,2:1, 1,1:1, 1:1, 1:1,1, 1:1,2, 1:1,3, 1:1,4, 1:1,5, 1:1,6, 1:1,7, 1:1,8, 1:1,9:1: 2, 1:2,5, 1:3, 1:3,5, 1:4, 1:4,5 o 1:5.

5 **[0032]** En algunos aspectos, el método resulta en una relación de dos tipos diferentes de células o poblaciones, tales como una relación de células CD4⁺ a CD8⁺, en la composición de salida que está entre, en, o aproximadamente 5:1 y en o sobre 1:5 (o mayor que aproximadamente 1:5 y menos de aproximadamente 5:1), tal como entre, en, o aproximadamente 1:3 y en o alrededor de 3:1 (o mayor que aproximadamente 1:3 y menos de aproximadamente 3:1),
10 como entre aproximadamente 2:1 y aproximadamente 1:5 (o mayor que aproximadamente 1:5 y menor que aproximadamente 2:1), o que sea aproximadamente 3:1, 2,9:1, 2,8:1, 2,7:1, 2,6:1, 2,5:1, 2,4:1, 2,3:1, 2,2:1, 2,1:1, 2:1, 1,9:1, 1,8:1, 1,7:1, 1,6:1, 1,5:1, 1,4:1, 1,3:1, 1,2:1, 1,1:1, 1:1, 1:1,1, 1:1,2, 1:1,3, 1:1,4, 1:1,5, 1:1,6, 1:1,7, 1:1,8, 1:1,9:1: 2, 1:2,5, 1:3, 1:3,5, 1:4, 1:4,5 o 1:5.

15 **[0033]** En algunos aspectos, la relación de salida deseada es de 1:1 o es aproximadamente 1:1.

[0034] En algunos aspectos, los métodos dan como resultado la relación de salida deseada o número(s) de células en la composición de salida, los resultados en una proporción o número en la composición de salida que está dentro de una cierta diferencia tolerada o rango de error de dicha una relación o número de salida deseado, y/o da como resultado dicha relación o número un cierto porcentaje del tiempo que se realiza el método, como al menos 50%, 55%,
20 60%, 65%, 70%, o aproximadamente 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más del 95% de las veces.

[0035] En algunos aspectos, la diferencia tolerada está dentro de aproximadamente 1%, aproximadamente el 2%, aproximadamente 3%, aproximadamente el 4% aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente el 15%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 25%, aproximadamente el 30%, aproximadamente 35%,
25 aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50% de la relación deseada. En algunos aspectos, la relación de salida está dentro del 20% de la relación deseada y/o está dentro de esa relación al menos el 80% del tiempo que se realizan los métodos.

[0036] En algunos métodos, la diferencia tolerada y/o la relación deseada de salida o el número(s) es o se ha determinado mediante la administración de diferentes tipos de células, tales como la administración de células CD4⁺ y CD8⁺, a uno o más sujetos en una pluralidad de proporciones o números de prueba, y evaluando uno o más parámetros. En algunos aspectos, la determinación de la relación o el número de resultados deseados o la diferencia tolerada incluye evaluar uno o más resultados después de la administración al sujeto. En algunos aspectos, los resultados incluyen aquellos seleccionados entre la mejora de un síntoma de la enfermedad y los resultados que indican seguridad y/o baja o ausencia de toxicidad.
35

[0037] En algunos métodos, se selecciona la relación de iniciación de cultivo basado en una capacidad de tasa de proliferación o la supervivencia de varios tipos de células aisladas, tales como la CD4⁺ y/o CD8⁺ primaria humana población de células T. En algunos métodos, la relación de iniciación del cultivo se selecciona en función de una fuente de la muestra, como el sujeto del que se deriva la muestra. Por ejemplo, en algunos aspectos, la muestra se deriva de un sujeto y la relación de iniciación del cultivo se selecciona en función de una enfermedad o afección que afecta a dicho sujeto y/o un tratamiento que el sujeto está recibiendo, ha recibido o recibirá, como un tratamiento conjunto para la administración con la terapia celular adoptiva. En algunos aspectos, la relación de iniciación del cultivo se selecciona en base a un fenotipo de una o más de las células o subtipos de células que se están aislando o cultivando,
40 como un 6 5 fenotipo de las poblaciones de células CD4⁺ y/o CD8⁺, como la expresión de un marcador de la superficie celular o la síntesis o secreción de uno o más factores, como las citocinas o las quimiocinas.
45

[0038] Algunos procedimientos comprenden la selección de la relación del cultivo-iniciación antes del Paso de incubación. En algunos aspectos, la selección se lleva a cabo midiendo la tasa de proliferación o la capacidad de supervivencia de una o más de las poblaciones de células aisladas o poblaciones de células que se incuban, como las células T humanas primarias CD4⁺ y/o las células CD8⁺ primarias aisladas humanas células T. En algunos aspectos, la selección se lleva a cabo evaluando un fenotipo de las células T humanas primarias CD4⁺ aisladas y/o las células T humanas primarias CD8⁺ aisladas. En algunos aspectos, el fenotipo seleccionado entre la expresión de un marcador de superficie y la secreción de una citocina u otro factor. En algunos aspectos, la selección se lleva a cabo evaluando la fuente de la muestra, p. ej., cuando se selecciona la relación de iniciación del cultivo en función de una enfermedad o afección que afecta a un sujeto del que se deriva la muestra.
50
55

[0039] Algunos métodos además incluir la determinación de una relación intermedia o el número de células, tales como un intermedio proporción de células CD4⁺ a CD8⁺, presente en el recipiente de cultivo en un punto de tiempo posterior a la iniciación de dicha incubación. En algunos aspectos, los métodos incluyen además ajustar uno o más parámetros y/o aumentar o disminuir el tiempo para llevar a cabo los pasos de incubación y/o ingeniería, en base a dicha relación intermedia. En un aspecto, el ajuste comprende aumentar o disminuir el número o el enriquecimiento de una o más poblaciones de células en el recipiente de cultivo, como aumentar o enriquecer las células CD4⁺ o CD8⁺ en el recipiente de cultivo, ajustar la temperatura y agregar un estimulante al recipiente de cultivo, ajustando la concentración de uno o más estimulantes en el recipiente de cultivo, y/o agregando y/o eliminando una subpoblación de células hacia o desde el recipiente de cultivo. En algunos aspectos, la determinación y/o el ajuste se llevan a cabo
60
65

mientras se mantiene la composición que se incuba dentro de un ambiente estéril o contenido. En algunos aspectos, la determinación y/o el ajuste se llevan a cabo de manera automatizada, tal como lo controla una computadora conectada a un dispositivo en donde se realizan los pasos.

5 **[0040]** En algunos aspectos, los pasos de aislamiento, incubación, y/o ingeniería se llevan a cabo en un entorno estéril o contenido y/o de forma automatizada, como controlado por un ordenador conectado a un dispositivo en donde los pasos se llevan a cabo.

10 **[0041]** En algunos aspectos, la población CD8⁺ en la composición iniciadora de cultivo que comprende al menos 50% de células T de memoria central (T_{CM}) o comprende menos de 20% de células ingenuas T (T_N).

15 **[0042]** En algunos métodos, la muestra se obtiene de un sujeto. En algunos aspectos, el sujeto es un sujeto al que dichas células modificadas por ingeniería genética, p. ej., células T, o células para la terapia celular adoptiva serán administradas o sujeto en necesidad de tal administración. En otros aspectos, el sujeto es un sujeto distinto de un sujeto al que se administrarán dichas células genéticamente modificadas, p. ej., células T o células para terapia adoptiva o es un sujeto que no necesita dicha terapia. Entre las muestras se encuentran muestras de sangre y derivadas de sangre, como muestras de glóbulos blancos, muestras de aféresis, muestras de leucaféresis, muestras de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y sangre completa.

20 **[0043]** En algunos aspectos, las condiciones estimulantes para la incubación o la ingeniería incluyen condiciones en las que las células T de la composición iniciadora de cultivo proliferan o se expanden. Por ejemplo, en algunos aspectos, la incubación se lleva a cabo en presencia de un agente capaz de activar uno o más dominios de señalización intracelular de uno o más componentes de un complejo TCR, como una cadena zeta CD3, o capaz de activar la señalización a través de tal complejo o componente. En algunos aspectos, la incubación se lleva a cabo en presencia de un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28, un anticuerpo anti-4-1BB, p. ej., tales anticuerpos acoplados o presentes en la superficie de un soporte sólido, como una perla y/o una citocina, como IL-2, IL-15, IL-7 y/o IL-21.

30 **[0044]** En algunos métodos, el receptor de antígeno por ingeniería genética es o incluye un receptor de células T (TCR), tales como una TCR de alta afinidad, o receptor no TCR funcional antígeno, tal como un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunos aspectos, el receptor se une específicamente a un antígeno expresado por las células de una enfermedad o afección a tratar. En algunos aspectos, el CAR contiene un dominio de reconocimiento de antígeno extracelular. En algunos aspectos, contiene además un dominio de señalización intracelular que comprende una secuencia que contiene ITAM y un dominio de señalización intracelular de una molécula coestimuladora de células T.

35 **[0045]** También se proporcionan células y composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas, producidas por cualquiera de los métodos o formas de realización, incluyendo las células de ingeniería genética y células para terapia celular adoptiva. También se proporcionan métodos para administrar tales células y composiciones a sujetos y usos de las células y composiciones en tales métodos. Por ejemplo, se proporcionan métodos de tratamiento llevados a cabo produciendo células de acuerdo con los métodos de producción celular y administrando células de la composición de salida o una composición derivada de las mismas a un sujeto. Se proporcionan métodos de tratamiento que incluyen administrar las células o composiciones proporcionadas a un sujeto. En algunos aspectos, la muestra de la que se aíslan las células se deriva del sujeto al que se administran las células. En algunos aspectos, la muestra es de un sujeto diferente. Por lo tanto, los métodos incluyen métodos autólogos y alogénicos. En algunas realizaciones, los métodos mejoran, tratan o previenen uno o más síntomas de una enfermedad o afección en el sujeto. En algunos aspectos, la enfermedad o afección es un cáncer o síntoma asociado. En algunas realizaciones, los cánceres incluyen leucemia, linfoma, p. ej., leucemia linfocítica crónica (CLL), ALL, linfoma no Hodgkin, leucemia mieloide aguda, mieloma múltiple, linfoma folicular refractario, linfoma de células del manto, linfoma de células B indolente, tumores malignos de células B, cánceres de colon, pulmón, hígado, mama, próstata, ovario, piel (incluyendo melanoma), hueso y cáncer de cerebro, cáncer del ovario, cánceres epiteliales, carcinoma de células renales, adenocarcinoma pancreático, linfoma de Hodgkin, carcinoma cervical, cáncer colorrectal, glioblastoma, neuroblastoma, sarcoma de Ewing, meduloblastoma, osteosarcoma, sarcoma sinovial y/o mesotelioma.

55 **Breve descripción de los dibujos**

[0046]

60 **Figura 1A:** proporciona una representación esquemática de una realización de un sistema cerrado para su uso en realizaciones de los métodos proporcionados. El sistema ejemplar ilustrado incluye una muestra de células 5, un depósito de tampón de lavado 6, un depósito de tampón de de elución 7, un primer depósito Fab 18, un segundo depósito Fab 19 y una bomba 8, conectada a través de una serie de tubos y válvulas 13, para una primera columna de cromatografía 1 que contiene una primera matriz 3 unida operativamente a través de una serie de líneas de tubos a una segunda columna de cromatografía 2 que contiene una segunda matriz 4. La segunda columna de cromatografía 2 está operativamente unida a una cámara de extracción 9. La cámara de aestá operativamente conectado a una válvula 13, que dirige las células y los fluidos a un

contenedor de residuos 10 o un recipiente de cultivo 12 a través de una serie de tuberías. El sistema está encerrado en un recinto 14.

Figura 1B: proporciona una representación esquemática de una realización de un sistema cerrado para su uso en realizaciones de los métodos proporcionados. El sistema ejemplar ilustrado incluye una muestra de células 5, un depósito de tampón de lavado 6, un depósito de tampón de de elución 7, un primer depósito de Fab 18, un segundo depósito de Fab 19, un tercer depósito de Fab 20 y una bomba 8, conectada a través de una serie de tubo a una primera columna de cromatografía 1 que contiene una primera matriz 3. Las válvulas 13 se unen operativamente a la serie de fluidos directos de tubo a través de la serie de tubo. Una válvula 13 unida operativamente a la primera columna de cromatografía 1 dirige las células y fluidos a una segunda columna de cromatografía 2 que contiene una segunda matriz 4, que está operativamente unida a una cámara de extracción 9. La válvula 13 unida operativamente a la primera columna 1 de cromatografía también dirige células y fluidos a una cámara de extracción 9, que está unida operativamente a una cromatografía tercera columna 15 que contiene una tercera matriz 16. La tercera columna de cromatografía 15 está unida operativamente a una cámara de extracción 9. Las cámaras de retirada 9 están unidas operativamente a una primera residuos recipiente 10 o un cultivo de recipiente 12 a través de la serie de líneas de tubería y válvulas 13. El sistema está encerrado en un recinto 14.

Descripción detallada

[0047] a menos que se defina lo contrario, todos los términos de la técnica, notaciones y otros términos técnicos y científicos o terminología utilizada en este documento se pretende que tengan el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la materia a la que pertenece el tema reivindicado. En algunos casos, los términos con significados comúnmente entendidos se definen en el presente documento para mayor claridad y/o para una referencia inmediata, y la inclusión de tales definiciones en el presente documento no debe interpretarse necesariamente como una diferencia sustancial sobre lo que generalmente se entiende en la técnica.

[0048] Los encabezados de sección usados en este documento son sólo para fines de organización y no deben interpretarse como limitantes de la materia descrita.

I. Métodos y sistemas para aislar, cultivar y modificar las células para la terapia adoptiva

[0049] Se proporcionan métodos para la preparación de células, p. ej., células T, para su uso en la ingeniería genética y métodos terapéuticos tales como la terapia celular adoptiva. Específicamente, en algunas realizaciones, los métodos usan o generan composiciones que contienen una pluralidad de diferentes poblaciones de células o tipos de células, tales como poblaciones y subpoblaciones de células T CD4⁺ y CD8⁺ aisladas. En algunas realizaciones, los métodos incluyen etapas para aislar una o más poblaciones celulares, generalmente una pluralidad de poblaciones celulares. Las células generalmente están aisladas de una muestra derivada de un sujeto.

[0050] En algunos aspectos, los métodos se llevan a cabo mediante el empleo de selecciones o enriquecimientos simultáneos o secuenciales en donde una pluralidad de diferentes poblaciones de células, tales como células CD4⁺ o CD8⁺, a partir de una muestra, como una muestra que contiene células T primarias humanas, se seleccionan, enriquecen y/o aíslan. En algunas realizaciones, dichos métodos se realizan usando una única corriente de procesamiento en donde se seleccionan, enriquecen y/o aíslan una primera población de células, como las células CD4⁺ o CD8⁺, y una segunda población de células, como la otra de las células CD4⁺ o CD8⁺ sin descartar ninguna célula de la primera población antes de realizar la selección de la segunda población de células. En algunos aspectos, las selecciones primera y segunda se pueden realizar de forma simultánea o secuencial. En algunas realizaciones, los métodos de selección se realizan como un flujo de proceso único realizando una primera selección para enriquecer una primera población de células, como una de las células CD4⁺ y CD8⁺ de una muestra, como una muestra que contiene células T humanas primarias y usar las células no seleccionadas de la primera selección como fuente de células para una segunda selección, como por ejemplo para la otra de las células CD4⁺ o CD8⁺ de la muestra.

[0051] En algunas realizaciones, una nueva selección o selecciones se pueden realizar de las primeras o segundas células seleccionadas. En algunas realizaciones, la selección adicional enriquece para una subpoblación de células CD4⁺ o CD8⁺ que expresan un marcador en células de memoria central T (T_{CM}) y/o enriquecen para una subpoblación de células que expresan CD62L, CD45RA, CD45RO, CCR7, CD27, CD127 o CD44.

[0052] En algunas realizaciones, los métodos de selección se llevan a cabo en un sistema o aparato cerrado. En algunas realizaciones, dentro del sistema o aparato cerrado, se genera una composición, tal como una composición de iniciación de cultivo, que contiene la población de células enriquecida o seleccionada, como las poblaciones enriquecidas o seleccionadas de CD4⁺ y CD8⁺, en la misma composición.

[0053] Por ejemplo, en algunos aspectos, el uno o más pasos se llevan a cabo con la pluralidad de poblaciones de células combinadas en la misma composición, o presentes en el mismo recipiente, p. ej., en el mismo sistema o aparato cerrado, o en el recipiente mismo, la unidad, o cámara, tal como la misma columna, p. ej., la columna de separación magnética, tubo, conjunto de tubos, el cultivo o cámara de cultivo, recipiente de cultivo, la unidad de procesamiento, recipiente de separación de células, la cámara de centrifugación, o utilizando la misma matriz de

separación, medios y/o reactivos, como la misma matriz, partícula o perla que responde magnéticamente o magnéticamente, el mismo soporte sólido, p. ej., soporte sólido marcado por afinidad, y/o los mismos anticuerpos y/u otros pares de unión, como anticuerpos marcados con fluorescencia y pares de unión, para la pluralidad de poblaciones celulares. En algunas realizaciones, el uno o más recipientes, unidades o cámaras, tales como columnas, están conectadas operativamente en el mismo sistema o aparato cerrado, de modo que los métodos de aislamiento, selección y/o enriquecimiento se producen en una única corriente de proceso en donde la población de células no seleccionadas de una primera selección se puede usar como fuente de células para una segunda selección.

[0054] En algunas realizaciones, el aislamiento de o enriquecimiento para una o más específicas poblaciones o subpoblaciones de células, p. ej., células T CD4⁺ y CD8⁺ a ser cultivadas o construidas para la terapia adoptiva, proporciona una o más ventajas. Por ejemplo, las células de ingeniería enriquecidas para una pluralidad de diferentes poblaciones celulares o tipos de células, como las poblaciones y subpoblaciones aisladas de células T CD4⁺ y CD8⁺, pueden mejorar la eficacia o reducir o evitar efectos no deseados. En algunos aspectos, el aislamiento o enriquecimiento aumenta la capacidad de las células finalmente administradas a un sujeto para persistir, expandirse, activarse y/o injertarse *in vivo* o tras la administración a un sujeto. En algunos aspectos, mejora o aumenta una o más funciones efectoras o fenotipo de activación. Por ejemplo, en algunos aspectos, enriquecer una población de células T, como una población de células T CD8⁺, para células de memoria central (T_{CM}) puede proporcionar tales ventajas. En algunos aspectos, una o más de tales ventajas son proporcionadas por la combinación de dos o más poblaciones aisladas o sub-tipos, tales como las poblaciones aisladas o sub-poblaciones de células T CD8⁺ y CD4⁺, tales como una población CD8⁺ enriquecida por T_{CM} y una población CD4⁺. Por ejemplo, tales ventajas se pueden lograr en algunos aspectos administrando una población CD4⁺ y una población CD8⁺ en comparación con una población CD8⁺ sola.

[0055] Los métodos en algunas realizaciones incluyen el procesamiento de una composición generada que contiene una pluralidad de las poblaciones de células aisladas o seleccionadas, tal como una población de células CD4⁺ y células CD8⁺ seleccionadas o enriquecidas. En una realización, el procesamiento de la composición generada incluye incubar las células en condiciones estimulantes, por ejemplo en algunos aspectos, para activar las células para ingeniería o transducción o para la expansión celular. Los métodos, en algunas realizaciones, incluyen etapas para diseñar una pluralidad de tipos de células, como las células CD4⁺ y las células CD8⁺, como las aisladas y presentes en la composición incubada, como la composición de iniciación del cultivo. En algunos aspectos, la ingeniería se lleva a cabo para introducir un receptor de antígeno genéticamente modificado en las células, como un TCR, p. ej., un TCR de alta afinidad, o un receptor de antígeno funcional no TCR, como un receptor de antígeno quimérico (CAR) En algunos aspectos, los métodos incluyen un procesamiento adicional, tal como una incubación adicional, por ejemplo en o alrededor de 37°C ± 2°C, y/o formulación de las células y composiciones que contienen la misma. En algunas realizaciones, el procesamiento produce una composición de salida resultante que contiene células genéticamente modificadas, tales como células CD4⁺ y células CD8⁺ modificadas genéticamente. En algunas realizaciones, la composición de salida procesada resultante puede usarse en métodos para administrar células y composiciones preparadas por los métodos a un paciente, p. ej., en relación con la terapia celular adoptiva.

[0056] En ciertas realizaciones, el aislamiento o separación se lleva a cabo usando un sistema, dispositivo o aparato que lleva a cabo una o más de las etapas de aislamiento, preparación de células, separación, procesamiento, incubación, cultivo, y/o formulación de los métodos. En algunos aspectos, el sistema se utiliza para llevar a cabo cada uno de estos pasos en un entorno cerrado o estéril, p. ej., para minimizar el error, el manejo del usuario y/o la contaminación. En un ejemplo, el sistema es un sistema como se describe en la Solicitud de Patente Internacional, número de publicación WO2009/072003, o US 20110003380 A1. En algunas realizaciones, el sistema es un aparato o sistema cerrado, tal como se representa en la Figura 1A o la Figura 1B. En algunas realizaciones, el sistema o aparato está automatizado y/o lleva a cabo los pasos de selección para enriquecer las células de acuerdo con los métodos de manera automatizada.

[0057] En algunas realizaciones, el sistema o aparato lleva a cabo el aislamiento, tales como los pasos de selección o enriquecimientos. En algunas realizaciones, se puede usar un sistema o aparato adicional, tal como un sistema o aparato cerrado, para llevar a cabo uno o más de los otros pasos, tales como pasos de preparación de células, procesamiento, incubación, cultivo y/o formulación del método. En algunas realizaciones, el sistema o aparato lleva a cabo uno o más, p. ej., todos los pasos de aislamiento, procesamiento, ingeniería y formulación en un sistema integrado o autónomo, y/o de manera automatizada o programable. En algunos aspectos, el sistema o aparato incluye una computadora y/o programa de computadora en comunicación con el sistema o aparato, que permite a un usuario programar, controlar, evaluar el resultado y/o ajustar varios aspectos de los pasos de procesamiento, aislamiento, ingeniería y formulación.

[0058] En algunas realizaciones, debido a que la composición enriquecida, tales como la composición del inicio del cultivo, se genera por los métodos proporcionados para contener diferentes poblaciones celulares, tales como CD4⁺ y CD8⁺, la composición generada puede procesarse conjuntamente y simultáneamente bajo las mismas condiciones, y en algunos aspectos, en un sistema cerrado. Por lo tanto, en algunos aspectos, los métodos proporcionan un proceso para producir y procesar una población de células seleccionadas, enriquecidas o aisladas que contienen diferentes poblaciones de células, como las células CD4⁺ y CD8⁺, en una sola secuencia de proceso. En algunos aspectos, esto difiere de los métodos de la técnica anterior, incluyendo los métodos de la técnica anterior que procesan células para

la ingeniería para la terapia celular adoptiva, que incluyen típicamente una corriente de proceso por separado para cada población de células diferentes, tales como al menos dos corrientes de proceso. Por ejemplo, en algunos aspectos de los métodos existentes, las células T CD4⁺ se aíslan, enriquecen y/o seleccionan y procesan por separado en condiciones estimulantes para la ingeniería genética, las células T CD8⁺ se aíslan, enriquecen y/o seleccionan por separado en condiciones estimulantes para la genética ingeniería, y las células T CD4⁺ y CD8⁺ procesadas y diseñadas por separado se vuelven a combinar antes de la administración a un sujeto.

[0059] En algunas realizaciones, los métodos proporcionan una o más ventajas en comparación con otro tipo de preparación, aislamiento, incubación, y métodos de ingeniería, como el ahorro de costes, de tiempo, y/o de recursos. Dichas ventajas pueden incluir la capacidad de aislar, procesar, p. ej., incubar y/o diseñar la pluralidad de poblaciones celulares, presentes en o cerca de una proporción deseada, con mayor eficiencia y/o complejidad, tiempo, costo y/o uso reducidos de recursos, en comparación con otros métodos.

[0060] En algunas realizaciones, tales ventajas se consiguen mediante la racionalización de una o más de las etapas del método. Por ejemplo, en algunos aspectos, el aislamiento, el cultivo y/o la ingeniería de las diferentes poblaciones se llevan a cabo utilizando el mismo aparato o equipo y/o simultáneamente. En algunos aspectos, el aislamiento, cultivo y/o ingeniería de las diferentes poblaciones se lleva a cabo en base a la misma composición inicial. En algunos aspectos, tales características de los métodos reducen la cantidad de tiempo, los pasos del método, el costo, la complejidad y/o la cantidad de recursos, en comparación con un método en donde las poblaciones celulares se aíslan, incuban y/o manipulan por separado, en recipientes separados, usando equipos separados, en momentos separados, y/o comenzando con diferentes composiciones de partida.

[0061] En algunos aspectos, los métodos de aislamiento, la incubación y la ingeniería de células dan como resultado una composición de salida en donde las diferentes poblaciones de células o tipos de células, tales como células CD4⁺ y células CD8⁺, están presentes en una proporción deseada, o dentro de un cierto grado de error tolerado de la relación deseada. Dichas proporciones incluyen las que se consideran óptimas para el uso terapéutico, p. ej., las proporciones de salida consideradas apropiadas u óptimas para la administración a un paciente en relación con la terapia celular adoptiva. También se proporcionan métodos para la administración de células y composiciones preparadas por los métodos a un paciente, p. ej., en conexión con la terapia celular adoptiva.

[0062] En algunas realizaciones, se llevan a cabo los métodos de aislamiento o la selección para lograr la selección de células en un cultivo elegido - relación de iniciación de células CD4⁺ a células CD8⁺ o una subpoblación de las mismas. En algunos aspectos, tales proporciones incluyen proporciones consideradas puntos de partida óptimos para lograr una proporción óptima, como una proporción deseada en la composición de salida, al completar el método o uno o más pasos, como seguir un cultivo, incubación y/o paso de ingeniería. En algunas realizaciones, proporcionar las células en una relación de iniciación de cultivo, tal como una relación de células CD4⁺ a células CD8⁺, explica las diferencias en la expansión de las células T CD4⁺ y CD8⁺ que pueden ocurrir tras la estimulación o activación con diferentes reactivos, para lograr una relación deseada en la composición de salida.

[0063] En algunas realizaciones, los métodos generan células modificadas o células para la ingeniería genética en, o dentro de un cierto porcentaje de una relación de salida deseada, o lo hacen al menos un cierto porcentaje del tiempo. La relación de salida deseada típicamente es una relación que se ha determinado que es óptima para la administración a un paciente mediante transferencia adoptiva. En algunas realizaciones, las poblaciones o subtipos de células, tales como las células T CD8⁺ y CD4⁺ se administran en o dentro de una diferencia tolerada de una dosis deseada de células totales, tal como una dosis deseada de células T. En algunos aspectos, la dosis deseada es un número deseado de células o un número deseado de células por unidad de peso corporal del sujeto al que se administran las células, p. ej., células/kg. En algunos aspectos, la dosis deseada es igual o superior a un número mínimo de células o un número mínimo de células por unidad de peso corporal. En algunos aspectos, entre las células totales, administradas a la dosis deseada, las poblaciones individuales o subtipos están presentes en o cerca de una relación de salida deseada (como la relación CD4⁺ a CD8⁺), p. ej., dentro de una cierta diferencia tolerada o error de tal proporción.

[0064] En algunas realizaciones, las células se administran en o dentro de una diferencia tolerada de una dosis deseada de una o más de las poblaciones individuales o sub-tipos de células, tales como una dosis deseada de células CD4⁺ y/o una dosis deseada de células CD8⁺. En algunos aspectos, la dosis deseada es un número deseado de células del subtipo o población, o un número deseado de tales células por unidad de peso corporal del sujeto al que se administran las células, p. ej., células/kg. En algunos aspectos, la dosis deseada es igual o superior a un número mínimo de células de la población o subtipo, o un número mínimo de células de la población o subtipo por unidad de peso corporal.

[0065] Por lo tanto, en algunas realizaciones, la dosificación se basa en una dosis fija deseada de células totales y una relación deseada, y/o basada en una dosis fija deseada de uno o más, p. ej., cada uno, de los sub-tipos individuales o subpoblaciones. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la dosis se basa en una dosis fija o mínima deseada de células T y una proporción deseada de células CD4⁺ a CD8⁺, y/o se basa en una dosis fija o mínima deseada de células CD4⁺ a CD8⁺.

[0066] En algunas realizaciones, se proporcionan procedimientos para determinar tales relaciones de salida óptima y/o dosis deseadas, y/o niveles de varianza de la relación deseada de salida o dosis deseada que sería tolerada, p. ej., una diferencia tolerada. En algunas realizaciones, con el fin de lograr la relación o dosis de salida deseadas (o para lograr tal relación, un cierto porcentaje del tiempo o dentro de un cierta diferencia tolerada), las poblaciones de células se combinan o incuban en proporciones (p. ej., proporciones de iniciación de cultivo) diseñadas para lograr la proporción de salida deseada para la transferencia adoptiva.

[0067] También se proporcionan métodos para determinar una relación de iniciación de cultivo diseñada para conseguir la relación de salida deseada o la dosis de hacerlo dentro de una cierta diferencia tolerada y/o un cierto porcentaje del tiempo. También se proporcionan métodos para evaluar proporciones o números provisionales de las poblaciones de células, como en uno o más periodos de tiempo en el transcurso de los diversos pasos del método, p. ej., durante la incubación. También se proporcionan métodos para ajustar diversas condiciones, como las condiciones de cultivo, basadas en tales evaluaciones. En algunos aspectos, los ajustes se llevan a cabo para garantizar que se alcance o se logre una relación o dosis de salida particular dentro de una diferencia tolerada.

[0068] En realizaciones particulares, se proporcionan procedimientos simplificados para la preparación de una composición que tiene en o cerca de una relación de salida deseada de una población de células T CD4⁺ y una población de células T CD8⁺ (p. ej., una población CD8⁺ enriquecida para un subtipo de células T, como las células T de memoria central), y/o una dosis deseada (p. ej., número o número por unidad de peso corporal) de células T CD4⁺ y/o de células T CD8⁺, para la introducción de un receptor de antígeno modificado por ingeniería genética para uso en terapia celular adoptiva, donde las poblaciones celulares se aíslan, incuban y/o manipulan en combinación y el método se asocia con una mayor eficiencia y/o una menor complejidad, tiempo, costo y/o uso de recursos en comparación con un método en donde las poblaciones se aíslan, incuban y/o manipulan por separado.

[0069] También se proporcionan células y composiciones preparadas por los métodos, incluyendo composiciones farmacéuticas y formulaciones y kits, sistemas y dispositivos para llevar a cabo los métodos. También se proporcionan métodos para el uso de las células y composiciones preparadas por los métodos, que incluyen métodos terapéuticos, tales como métodos para terapia celular adoptiva y composiciones farmacéuticas para administración a sujetos.

A. Aislamiento, células aisladas, y otros pasos de procesamiento

[0070] Entre las realizaciones se proporcionan procedimientos para aislar una pluralidad de células y poblaciones de células de una muestra, así como células aisladas, como células enriquecidas, producidas por tales métodos. El aislamiento puede incluir uno o más de los diversos pasos de preparación y separación de células, incluyendo la separación basada en una o más propiedades, tales como tamaño, densidad, sensibilidad o resistencia a los reactivos particulares, y/o afinidad, p. ej., de inmunofluorescencia, a anticuerpos u otros socios vinculantes. En algunos aspectos, el aislamiento se lleva a cabo utilizando el mismo aparato o equipo secuencialmente en un solo flujo de proceso y/o simultáneamente. En algunos aspectos, el aislamiento, el cultivo y/o la ingeniería de las diferentes poblaciones se lleva a cabo a partir de la misma composición o material de partida, como la misma muestra.

[0071] En algunos aspectos, la pluralidad de poblaciones de células está aislada en el mismo sistema o aparato cerrado, y/o en el mismo recipiente o conjunto de vasos, p. ej., la misma (o del mismo conjunto de) unidad, la cámara, la columna, p. ej., columna de separación magnética, tubo, conjunto de tubos, cultivo o cámara de cultivo, recipiente de cultivo, unidad de procesamiento, recipiente de separación celular, cámara de centrifugación. Por ejemplo, en algunos casos, el aislamiento de una pluralidad de poblaciones celulares se lleva a cabo en un sistema o aparato que emplea uno solo o el mismo recipiente o conjunto de vasos de aislamiento o separación, como una sola columna o conjunto de columnas, y/o el mismo tubo o conjunto de tubos, p. ej., sin requisitos para transferir la población celular, composición o suspensión de un recipiente, p. ej., conjunto de tubos, a otro.

[0072] En algunos aspectos, tales métodos se consiguen mediante un único flujo de proceso, tal como en un sistema cerrado, por el empleo de selecciones simultáneas o secuenciales en donde una pluralidad de diferentes poblaciones de células, tales como células CD4⁺ o CD8⁺, a partir de una muestra, tales como una muestra que contiene células T humanas primarias, se seleccionan, enriquecen y/o aíslan. En una realización, una muestra que contiene células se somete a una selección mediante enriquecimiento simultáneo de las poblaciones CD4⁺ y CD8⁺. En algunos aspectos, la separación o el aislamiento en el mismo recipiente o conjunto de recipientes, p. ej., conjunto de tubos, se logra llevando a cabo pasos de selección secuenciales positivos y negativos, el paso posterior somete la fracción negativa y/o positiva del anterior paso para una mayor selección, donde todo el proceso se lleva a cabo en el mismo tubo o conjunto de tubos. En una realización, una muestra que contiene células a seleccionar se somete a una selección secuencial en donde se efectúa una primera selección para enriquecer para una de las poblaciones CD4⁺ o CD8⁺, y las células no seleccionadas de la primera selección se usan como fuente de células para una segunda selección para enriquecer para la otra de las poblaciones CD4⁺ o CD8⁺. En algunas realizaciones, se puede efectuar una selección o selecciones adicionales para enriquecer las subpoblaciones de una o ambas poblaciones CD4⁺ o CD8⁺, p. ej., células T (T_{CM}) de memoria central.

[0073] En un aspecto particular, una primera etapa de selección se lleva a cabo usando perlas marcadas con moléculas de unión a CD4, tales como anticuerpos (o reactivos secundarios que reconocen tales moléculas), y las

fracciones positivas y negativas de la primera etapa de selección se retienen, seguido de una selección positiva o negativa adicional de la fracción negativa para enriquecer las células CD8⁺, como mediante el uso de microesferas marcadas con moléculas de unión a CD8, y opcionalmente la selección de una subpoblación de células de la fracción CD8⁺, como las células T CD8⁺ de memoria central y/o células que expresan uno o más marcadores CD62L, CD45RA, CD45RO, CCR7, CD27, CD127 o CD44. En algunas realizaciones, el orden de las selecciones puede invertirse. En algunas realizaciones, una selección CD4 siempre se realiza primero y, a partir de la fracción negativa (CD4), la fracción CD8⁺ se enriquece en una segunda selección, p. ej., por selección negativa para una o más de CD45RA + y CD14, y/o selección positiva para uno o más de CD62L, CCR7 y/u otros marcadores expresados en células de memoria central.

[0074] En algunas realizaciones, una pluralidad de poblaciones de células, p. ej., una población de células T CD4⁺ y una población de células T CD8⁺, está aislada, por ejemplo, para producir una composición iniciadora de cultivo que contenga la pluralidad de poblaciones celulares. La composición iniciadora del cultivo típicamente contiene las células en una relación iniciadora de cultivo, que está diseñada para producir una relación de salida deseada particular de dos o más tipos de células, como una relación particular CD4⁺ a CD8⁺, después de uno o más pasos de incubación, cultivo, y/o ingeniería. La relación de salida deseada en algunas realizaciones es una relación diseñada para ser óptima para la administración de las células a un paciente, p. ej., en terapia celular adoptiva.

[0075] En algunos aspectos, el aislamiento de la pluralidad de las poblaciones en un único o en el mismo recipiente de aislamiento o separación o conjunto de vasos, como una sola columna o conjunto de columnas, y/o mismo tubo o conjunto de tubos o el uso de la misma matriz de separación o medios o reactivos, como la misma matriz magnética, el soporte sólido marcado por afinidad o los anticuerpos u otros pares de unión, incluyen características que simplifican el aislamiento, p. ej., reduciendo el costo, el tiempo, la complejidad y la necesidad de manipulación de muestras, uso de recursos, reactivos o equipos. En algunos aspectos, tales características son ventajosas ya que minimizan el costo, la eficiencia, el tiempo y/o la complejidad asociados con los métodos, y/o evitan el daño potencial al producto celular, como el daño causado por infección, contaminación y/o cambios de temperatura.

[0076] En algunas realizaciones, las poblaciones de células aisladas obtenidas para su uso en los presentes métodos son estériles. La contaminación microbiana de los productos de separación celular puede en algunos casos conducir a la infección del sujeto receptor, como un paciente receptor inmunocomprometido que no puede combatir la infección. En algunas realizaciones, las células, las poblaciones de células y las composiciones se producen en condiciones de GMP (buenas prácticas de fabricación). En algunas realizaciones, las condiciones de GMP comprenden pruebas de lote estrictas. En ciertas realizaciones, la tipificación de tejidos se realiza antes del trasplante, p. ej., para evitar la falta de coincidencia del antígeno leucocitario humano (HLA) y prevenir problemas tales como la enfermedad de injerto contra huésped. En algunas realizaciones, los métodos proporcionados reducen el manejo por parte de usuarios individuales y automatizan varios pasos, lo que en algunos aspectos puede aumentar la consistencia de las poblaciones y composiciones celulares aisladas y reduce el error, promoviendo así la consistencia de la terapia y la seguridad.

1. Células y poblaciones de células

[0077] En algunas realizaciones, los métodos incluyen la realización de una selección, aislamiento y/o enriquecimiento de una muestra de células, tal como una muestra celular humana primaria. Las poblaciones de células aisladas típicamente incluyen una pluralidad de poblaciones de células, generalmente poblaciones de sangre o células derivadas de la sangre, tales como células hematopoyéticas, leucocitos (glóbulos blancos), células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y/o células del sistema inmune., p. ej., células de la inmunidad innata o adaptativa, tales como células mieloides o linfoides, p. ej., linfocitos, típicamente células T y/o células NK. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de aféresis o leucaféresis. En algunas realizaciones, la selección, aislamiento y/o enriquecimiento puede incluir una selección positiva o negativa de células de la muestra.

[0078] En algunas realizaciones, la muestra es una muestra que contiene células T humanas primarias, tales como células CD4⁺ y CD8⁺. En realizaciones particulares, la muestra es una en donde se aísla una pluralidad de poblaciones de células T, tal como una población de células CD4⁺ y una población de células T CD8⁺. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el aislamiento incluye selección positiva para células que expresan CD4 o células que expresan CD8 y/o selección negativa para células que expresan marcadores de células no T, tales como marcadores mieloides o de células B, p. ej., selección negativa para células que expresan CD14, CD19, CD56, CD20, CD11b y/o CD16.

[0079] En algunas realizaciones, la muestra es una que contiene una pluralidad de poblaciones que incluye una población de células T, tal como una célula entera T o la población CD4⁺, y una población de células NK. Entre las poblaciones de células T que pueden enriquecerse, aislarse y/o seleccionarse se encuentran las poblaciones de células T no fraccionadas, células CD4⁺ no fraccionadas, células CD8⁺ no fraccionadas y subpoblaciones de células T CD4⁺ y/o CD8⁺, incluidas las subpoblaciones de células T generadas por enriquecimiento o agotamiento de células de un subtipo particular o basado en un perfil de expresión de marcador de superficie particular.

[0080] Por ejemplo, entre los sub-tipos de células T (p. ej., células CD4⁺ o CD8⁺ T) que pueden ser enriquecidos, aislados y/o seleccionados son los definidos por la función, estado de activación, la madurez, potencial de

diferenciación, capacidad de expansión, recirculación, localización y/o persistencia, especificidad de antígeno, tipo de receptor de antígeno, presencia en un órgano o compartimento particular, perfil de secreción de marcador o citocina, y/o grado de diferenciación.

5 **[0081]** Entre los sub-tipos y subpoblaciones de células T y/o de CD4⁺ y/o de las células T CD8⁺ que pueden ser enriquecidos, aislados y/o seleccionados son células T ingenuas (TN), células T efectoras (TEFF), células T de memoria y subtipos de las mismas, tales como células madre T de memoria (TSCM), memoria central T (TCM), memoria efectora T (TEM), o células T de memoria efectoras diferenciadas terminalmente, linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), células T inmaduras, células T maduras, células T auxiliares, células T citotóxicas, las células T invariantes (MAIT) asociadas a la mucosa, que se producen de forma natural y células (Treg), células T auxiliares, T reguladoras de adaptación tales como las células TH1, las células TH2, células TH3, Células TH17, células TH9, células TH22, células T auxiliares foliculares, células T alfa/beta y células T delta/gamma.

15 **[0082]** En algunas realizaciones, una o más de las poblaciones de células T enriquecidas, aisladas y/o seleccionadas de una muestra por los métodos proporcionados son células que son positivas para (marcador+) o expresan niveles altos (marcador alto) de uno o más marcadores particulares, como los marcadores de superficie, o que son negativos para (marcador) o expresan niveles relativamente bajos (marcador bajo) de uno o más marcadores. En algunos casos, dichos marcadores son aquellos que están ausentes o expresados a niveles relativamente bajos en ciertas poblaciones de células T (como las células sin memoria) pero que están presentes o expresadas a niveles relativamente más altos en ciertas otras poblaciones de células T (como las células de memoria). En una realización, las células (tales como las células CD8⁺ o las células T, p. ej., las células CD3⁺) se enriquecen para (es decir, se seleccionan positivamente para) las células que son positivas o que expresan altos niveles de superficie de CD45RO, CCR7, CD28, CD27, CD44, CD127 y/o CD62L y/o empobrecidas de (p. ej., seleccionadas negativamente para) las células que son positivas para o expresan altos niveles de superficie de CD45RA. En algunas realizaciones, las células se enriquecen o se agotan de células positivas o que expresan altos niveles de superficie de CD122, CD95, CD25, CD27 y/o IL7-R α (CD127). En algunos ejemplos, las células T CD8⁺ se enriquecen para células positivas para CD45RO (o negativas para CD45RA) y para CD62L.

30 **[0083]** En algunas realizaciones, una población de células T CD4⁺ y una subpoblación de células T CD8⁺, p. ej., una sub-población enriquecida para las células de memoria central (TCM).

35 **[0084]** En algunas realizaciones, las células son células asesinas naturales (NK). En algunas realizaciones, las células son monocitos o granulocitos, p. ej., células mieloides, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, mastocitos, eosinófilos y/o basófilos.

2. Muestras

40 **[0085]** Las células y poblaciones de células son típicamente aisladas de una muestra, tal como una muestra biológica, p. ej., una obtenida a partir de o derivada de un sujeto, tales como uno que tiene una enfermedad en particular o condición o en necesidad de una terapia de células o a la que se administrará la terapia celular. En algunos aspectos, el sujeto es un ser humano, como un sujeto que necesita un paciente para una intervención terapéutica particular, como la terapia celular adoptiva para la cual las células están siendo aisladas, procesadas y/o manipuladas. Por consiguiente, las células en algunas realizaciones son células primarias, p. ej., células humanas primarias. Las muestras incluyen muestras de tejido, líquido y otras tomadas directamente del sujeto, así como muestras resultantes de uno o más pasos de procesamiento, como separación, centrifugación, ingeniería genética (p. ej., transducción con vector viral), lavado y/o incubación. La muestra biológica puede ser una muestra obtenida directamente de una fuente biológica o una muestra que se procesa. Las muestras biológicas incluyen, entre otras, fluidos corporales, como sangre, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, orina y sudor, muestras de tejidos y órganos, incluidas muestras procesadas derivadas de los mismos.

50 **[0086]** En algunos aspectos, la muestra es sangre o una muestra derivada de sangre, o es o se deriva de una aféresis o producto de leucoféresis. Las muestras ejemplares incluyen sangre completa, células mononucleares de sangre periférica (PBMC), leucocitos, médula ósea, timo, biopsia de tejido, tumor, leucemia, linfoma, ganglio linfático, tejido linfoide asociado al intestino, tejido linfoide asociado a la mucosa, bazo, otros tejidos linfoides, hígado, pulmón, estómago, intestino, colon, riñón, páncreas, mama, hueso, próstata, cuello uterino, testículos, ovarios, amígdalas u otro órgano, y/o células derivadas del mismo. Las muestras incluyen, en el contexto de la terapia celular, p. ej., terapia celular adoptiva, muestras de fuentes autólogas y alogénicas.

60 **[0087]** En algunas realizaciones, las células se derivan de líneas celulares, p. ej., líneas de células T. Las células en algunas realizaciones se obtienen de una fuente xenogénica, p. ej., de ratón, rata, primate no humano y cerdo.

3. Procesamiento de células, la preparación y la separación no basada en afinidad

65 **[0088]** En algunas realizaciones, el aislamiento de las células o poblaciones incluye uno o más pasos de separación de células basadas en preparación y/o afinidad. En algunos ejemplos, las células se lavan, se centrifugan, y/o se incubaron en la presencia de uno o más reactivos, p. ej., para eliminar los componentes no deseados, enriquecer para

los componentes deseados, se lisan o eliminar las células sensibles a los reactivos particulares. En algunos ejemplos, las células se separan en función de una o más propiedades, como la densidad, las propiedades adherentes, el tamaño, la sensibilidad y/o la resistencia a componentes particulares.

5 **[0089]** En algunos ejemplos, se obtienen las células de la sangre circulante de un sujeto, p. ej., mediante aféresis o leucaféresis. Las muestras, en algunos aspectos, contienen linfocitos, que incluyen células T, monocitos, granulocitos, células B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y/o plaquetas, y en algunos aspectos contiene células distintas de los glóbulos rojos y las plaquetas.

10 **[0090]** En algunas realizaciones, las células de sangre recogidas del sujeto se lavan, p. ej., para eliminar la fracción de plasma y para colocar las células en un tampón o medio de comunicación adecuado para los pasos de procesamiento posteriores. En algunas realizaciones, las células se lavan con solución salina tamponada con fosfato (PBS). En algunas realizaciones, la solución de lavado carece de calcio y/o magnesio y/o muchos o todos los cationes divalentes. En algunos aspectos, una etapa de lavado se realiza con una centrífuga semiautomática de "flujo continuo" (p. ej., el procesador de células Cobe 2991, Baxter) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En algunos aspectos, un paso de lavado se realiza mediante filtración de flujo tangencial (TFF) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En algunas realizaciones, las células se resuspenden en una variedad de tampones biocompatibles después del lavado, tales como, p. ej., PBS libre de Ca^{++}/Mg^{++} . En ciertas realizaciones, los componentes de una muestra de células sanguíneas se eliminan y las células se resuspenden directamente en medios de cultivo.

20 **[0091]** En algunas realizaciones, los métodos incluyen métodos de separación de células basada en la densidad, tales como la preparación de las células blancas de la sangre de la sangre periférica mediante lisis de las células sanguíneas rojas y centrifugación a través de un gradiente de Percoll o Ficoll.

25 *4. Separación basada en afinidad y/o el perfil de marcador*

[0092] En algunas realizaciones, los métodos de aislamiento incluyen la separación de diferentes tipos de células en base a la expresión o presencia en la célula de una o más moléculas específicas, tales como marcadores de superficie, p. ej., proteínas de superficie, marcadores intracelulares o ácido nucleico. En algunas realizaciones, se puede usar cualquier método conocido para la separación basada en tales marcadores. En algunas realizaciones, la separación es una separación basada en afinidad o inmunoafinidad. Por ejemplo, el aislamiento en algunos aspectos incluye la separación de células y poblaciones celulares en función de la expresión de las células o el nivel de expresión de uno o más marcadores, típicamente marcadores de la superficie celular, p. ej., mediante incubación con un anticuerpo o par de unión que se une específicamente a tales marcadores, seguidos generalmente por pasos de lavado y separación de células que se han unido al anticuerpo o par de unión, de aquellas células que no se han unido al anticuerpo o par de unión.

40 **[0093]** Tales etapas de separación se pueden basar en la selección positiva, en donde las células que han unido a los reactivos se conservan para su uso posterior, y/o de selección negativa, en donde las células que no han unido al anticuerpo o pareja de unión son retenidas. En algunos ejemplos, ambas fracciones se retienen para su uso posterior. En algunos aspectos, la selección negativa puede ser particularmente útil cuando no hay anticuerpos disponibles que identifiquen específicamente un tipo de célula en una población heterogénea, de modo que la separación se realice mejor en función de los marcadores expresados por las células que no sean la población deseada.

45 **[0094]** La separación no tiene por qué resultar en 100% de enriquecimiento o eliminación de una población celular particular, o células que expresan un marcador particular. Por ejemplo, la selección positiva o el enriquecimiento de las células de un tipo particular, como las que expresan un marcador, se refiere al aumento del número o porcentaje de dichas células, pero no necesariamente resulta en una ausencia completa de células que no expresan el marcador. Del mismo modo, la selección negativa, la eliminación o el agotamiento de las células de un tipo particular, como las que expresan un marcador, se refiere a la disminución del número o porcentaje de dichas células, pero no necesariamente tiene como resultado la eliminación completa de todas esas células. Por ejemplo, en algunos aspectos, una selección de una de las poblaciones $CD4^+$ o $CD8^+$ enriquece para dicha población, ya sea la población $CD4^+$ o $CD8^+$, pero también puede contener algún porcentaje residual o pequeño de otras células no seleccionadas, que pueden, en algunos casos, incluyen el otro de la población $CD4$ o $CD8$ que todavía está presente en la población enriquecida.

60 **[0095]** En algunos ejemplos, múltiples rondas de etapas de separación se llevan a cabo, en donde la fracción seleccionada positiva o negativamente de una etapa se somete a otra etapa de separación, tal como una posterior selección positiva o negativa. En algunos ejemplos, un solo paso de separación puede agotar las células que expresan múltiples marcadores simultáneamente, como incubando células con una pluralidad de anticuerpos o pares de unión, cada uno específico para un marcador dirigido a la selección negativa. Del mismo modo, se pueden seleccionar simultáneamente múltiples tipos de células incubando células con una pluralidad de anticuerpos o pares de unión expresados en los diversos tipos de células.

65 **[0096]** Por ejemplo, en algunos aspectos, las subpoblaciones específicas de células T, tales como células positivas o que expresan altos niveles de marcadores de una o más superficies, p. ej., las células T $CD28^+$, $CD62L^+$, $CCR7^+$,

CD27⁺, CD127⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺ y/o CD45RO⁺, se aíslan mediante técnicas de selección positivas o negativas.

[0097] Por ejemplo, las células T CD3⁺, CD28⁺ se pueden seleccionar positivamente utilizando perlas magnéticas CD3/CD28 conjugadas (p. ej., Dynabeads® M-450 CD3/CD28 T Cell Expander).

[0098] En algunas realizaciones, el aislamiento se lleva a cabo mediante enriquecimiento para una población celular particular por la selección positiva, o el agotamiento de una población celular particular, por selección negativa. En algunas realizaciones, 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 (marcador⁺) a un nivel relativamente más alto (marcador^{alto}) en las células negativamente seleccionadas, respectivamente.

[0099] En algunas realizaciones, las células T están separadas de una muestra de PBMC por selección negativa de marcadores expresados en células no T, como las células B, monocitos, u otras células blancas de la sangre, tales como CD14. En algunas realizaciones, los métodos incluyen aislamiento, selección y/o enriquecimiento de células CD4⁺ y CD8⁺. En un ejemplo, para enriquecer las células CD4⁺ mediante selección negativa, un cóctel de anticuerpos monoclonales típicamente incluye anticuerpos contra CD14, CD20, CD11b, CD16 y HLADR. En un ejemplo, el enriquecimiento para una población CD8⁺ mediante selección negativa se lleva a cabo mediante el agotamiento de las células que expresan CD14 y/o CD45RA. En algunos aspectos, una etapa de selección de CD4⁺ o CD8⁺, como la selección positiva para CD4 y la selección positiva para CD8, se usa para separar las células T citotóxicas CD4⁺ auxiliar y CD8⁺. Dichas selecciones en algunos aspectos se llevan a cabo simultáneamente y en otros aspectos se llevan a cabo secuencialmente, en cualquier orden.

[0100] En algunos aspectos, los métodos incluyen una primera selección positiva para células CD4⁺ en donde las células no seleccionadas se utilizan (células CD4⁻) de la primera selección como la fuente de células para una segunda selección positiva para enriquecer en células CD8⁺. En algunos aspectos, los métodos incluyen una primera selección positiva para las células CD8⁺ en donde las células no seleccionadas (células CD8⁻) de la primera selección se utilizan como fuente de células para una segunda selección de posición para enriquecer las células CD4⁺. Dichas poblaciones CD4⁺ y CD8⁺ pueden clasificarse adicionalmente en subpoblaciones mediante selección positiva o negativa para marcadores expresados o expresados en un grado relativamente mayor en una o más subpoblaciones de células T ingenuas, de memoria y/o efectoras.

[0101] En algunas realizaciones, las células CD4⁺ se enriquecen adicionalmente o se privan de células madre ingenuas, memoria central, memoria efectora y/o memoria central, como por la selección positiva o negativa basada en antígenos de superficie asociados con la población respectiva. Las células T CD4⁺ auxiliares se clasifican en células ingenuas, de memoria central y efectoras mediante la identificación de poblaciones celulares que tienen antígenos de superficie celular. Los linfocitos CD4⁺ se pueden obtener por métodos estándar. En algunas formas de realización, los linfocitos T ingenuos CD4⁺ son células T CD45RO⁻, CD45RA⁺, CD62L⁺, CD4⁺. En algunas realizaciones, las células CD4⁺ de memoria central son CD62L⁺ y CD45RO⁺. En algunas realizaciones, las células efectoras CD4⁺ son CD62L⁻ y CD45RO⁻.

[0102] En algunas realizaciones, las células CD8⁺ se enriquecen adicionalmente o se privan de células madre ingenuas, memoria central, memoria efectora y/o memoria central, como por selección positiva o negativa basada en antígenos de superficie asociados con la subpoblación respectiva. En algunas realizaciones, el enriquecimiento para las células T (T_{CM}) de memoria central se lleva a cabo para aumentar la eficacia, tal como para mejorar la supervivencia a largo plazo, la expansión y/o el injerto después de la administración, que en algunos aspectos es particularmente robusto en tales sub-poblaciones. Ver Terakura et al. (2012) Blood. 1: 72-82; Wang y col. (2012) J Immunother. 35 (9): 689-701. En algunas realizaciones, la combinación de T_{CM} enriquecido en células T CD8⁺ y células T CD4⁺ mejora aún más la eficacia.

[0103] En las realizaciones, las células T de memoria están presentes en los subconjuntos CD62L⁺ y CD62L⁻ de linfocitos de sangre periférica CD8⁺. PBMC puede enriquecerse o reducirse de las fracciones CD62L-CD8⁺ y/o CD62L⁺CD8⁺, como el uso de anticuerpos antiCD8 y anti-CD62L.

[0104] En algunas realizaciones, el enriquecimiento para las células T (T_{CM}) de memoria central se basa en la expresión superficial positiva o alta de CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD27 y/o CD 127; en algunos aspectos, se basa en la selección negativa para células que expresan o expresan altamente CD45RA y/o granzima B.

[0105] En algunas realizaciones, los métodos proporcionados incluyen aislamiento, selección y/o enriquecimiento de células CD8⁺ de una muestra, como por selección positiva basada en la expresión superficial de CD8. En algunas realizaciones, los métodos pueden incluir además enriquecimiento para células T (T_{CM}) de memoria central. En un aspecto, las células CD8⁺ enriquecidas pueden enriquecerse aún más para las células T (T_{CM}) de memoria central seleccionando uno o más marcadores expresados en las células T (T_{CM}) de memoria central, como uno o más de CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD27 y/o CD 127. La selección puede realizarse antes o después del aislamiento, selección y/o enriquecimiento de células CD4⁺. Dichas selecciones en algunos aspectos se llevan a cabo simultáneamente y en otros aspectos se llevan a cabo secuencialmente, en cualquier orden.

[0106] En algunos aspectos, los métodos incluyen una primera selección positiva para células CD4⁺ en donde las células no seleccionadas (células CD4⁻) de la primera selección se usan como fuente de células para una segunda selección para enriquecer las células CD8⁺, y las células CD8⁺ enriquecidas o seleccionadas se usan en una tercera selección para enriquecer aún más las células que expresan uno o más marcadores expresados en las células T (T_{CM}) de memoria central, como por una tercera selección para enriquecer para células CD45RO⁺, CD62L⁺, CCR7⁺, CD28⁺, CD3⁺, CD27 + y/o CD127⁺. En algunos aspectos, los métodos incluyen una primera selección positiva para las células CD8⁺ en donde las células no seleccionadas (células CD8⁻) de la primera selección se utilizan como fuente de células para que la segunda selección se enriquezca para las células CD4⁺, y las enriquecidas o las células CD8⁺ seleccionadas de la primera selección también se usan en una tercera selección para enriquecer aún más las células que expresan uno o más marcadores expresados en las células T (T_{CM}) de memoria central, como por una tercera selección para enriquecer para células CD45RO⁺, CD62L⁺, CCR7⁺, CD28⁺, CD3⁺, CD27⁺ y/o CD127⁺.

[0107] En algunos aspectos, el aislamiento de una población CD8⁺ enriquecida para células T_{CM} se lleva a cabo mediante el agotamiento de las células que expresan CD4, CD14, CD45RA, y la selección positiva o enriquecimiento para las células que expresan CD62L. En un aspecto, el enriquecimiento para las células T (T_{CM}) de memoria central se lleva a cabo comenzando con una fracción negativa de células seleccionadas en función de la expresión de CD4, que se somete a una selección negativa basada en la expresión de CD14 y CD45RA, y una selección positiva basada en CD62L. Dichas selecciones en algunos aspectos se llevan a cabo simultáneamente y en otros aspectos se llevan a cabo secuencialmente, en cualquier orden. En algunos aspectos, el mismo paso de selección basado en la expresión de CD4 utilizado en la preparación de la población o subpoblación de células CD8⁺, también se utiliza para generar la población o subpoblación de células CD4⁺, de modo que las fracciones positivas y negativas de la separación basada en CD4 se retiene y se usa en los pasos posteriores de los métodos, opcionalmente siguiendo uno o más pasos de selección positiva o negativa adicionales.

[0108] En un ejemplo particular, una muestra de PBMC u otra muestra de glóbulos blancos se somete a la selección de células CD4⁺, donde se retienen las fracciones positivas y negativas. La fracción negativa se somete a una selección negativa basada en la expresión de CD14 y CD45RA o CD19, y una selección positiva basada en un marcador característico de las células T de memoria central, como CD62L o CCR7, donde las selecciones positivas y negativas se llevan a cabo en orden.

[0109] En algunas realizaciones, los métodos de aislamiento, selección y/o enriquecimiento de células, tales como mediante selección positiva o negativa basada en la expresión de un marcador o marcadores de superficie celular, por ejemplo por cualquiera de los métodos descritos anteriormente, pueden incluir selecciones basadas en inmunoafinidad. En algunas realizaciones, las selecciones basadas en inmunoafinidad incluyen poner en contacto una muestra que contiene células, tales como células T humanas primarias que contienen células CD4⁺ y CD8⁺, con un anticuerpo o par de unión que se une específicamente al marcador o marcadores de la superficie celular. En algunas realizaciones, el anticuerpo o par de unión se une a un soporte sólido o matriz, tal como una esfera o perla, por ejemplo microperlas, nanoperlas, que incluyen agarosa, perla magnética o perlas paramagnéticas, para permitir la separación de células positivas y/o selección negativa. En algunas realizaciones, las esferas o perlas se pueden empaquetar en una columna para efectuar la cromatografía de inmunoafinidad, en donde una muestra que contiene células, como las células T humanas primarias que contienen células CD4⁺ y CD8⁺, se pone en contacto con la matriz de la columna y luego se eluye o se libera de allí.

a. Perlas de inmunoafinidad

[0110] P. ej., en algunas realizaciones, las células y las poblaciones celulares se separan o aíslan usando técnicas de separación inmunomagnética (o por afinidad magnética) (revisado en *Methods in Molecular Medicine*, vol. 58: *Metastasis Research Protocols*, Vol. 2: *Comportamiento celular in vitro e in vivo*, p-17-25 Editado por: SA Brooks y U. Schumacher © Humana Press Inc., Totowa, NJ).

[0111] En algunos aspectos, la muestra o composición de células a separar se incuba con material pequeño, magnetizable o magnéticamente sensible, tal como partículas o micropartículas magnéticamente sensibles, tales como perlas paramagnéticas. El material que responde magnéticamente, p. ej., una partícula, generalmente se une directa o indirectamente a un par 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. Dichas perlas son conocidas y están disponibles comercialmente en una variedad de fuentes que incluyen, en algunos aspectos, Dynabeads® (Life Technologies, Carlsbad, CA), perlas MACS® (Miltenyi Biotec, San Diego, CA) o reactivos de perlas Streptamer® (IBA) Alemania).

[0112] En algunas realizaciones, la partícula o perla magnética comprende un material magnéticamente sensible unido a un miembro de unión específico, tal como un anticuerpo u otro par de unión. Existen muchos materiales magnéticamente sensibles conocidos que se utilizan en los métodos de separación magnética. Las partículas magnéticas adecuadas incluyen las descritas en Molday, patente de EE.UU. 4,452,773, y en la Especificación de Patente Europea EP 452342 B. Partículas coloidales, como las descritas en Owen US Pat. 4,795,698, y Liberti et al., Patente de EE.UU. N° 5,200,084 son otros ejemplos.

[0113] La incubación generalmente se lleva a cabo bajo condiciones en donde los anticuerpos o parejas de unión, o moléculas, tales como anticuerpos secundarios u otros reactivos, que se unen específicamente a dichos anticuerpos o parejas de unión, que están unidas a la partícula magnética o perla, en concreto se unen a las moléculas de la superficie celular si están presentes en las células dentro de la muestra.

[0114] En algunos aspectos, la muestra se coloca en un campo magnético, y aquellas células que tienen partículas magnéticamente sensibles o magnetizables unidas al mismo serán atraídas al imán y separadas de las células no marcadas. Para la selección positiva, se retienen las células que se sienten atraídas por el imán; para la selección negativa, las células que no son atraídas (células no marcadas) se retienen. En algunos aspectos, se realiza una combinación de selección positiva y negativa durante el mismo paso de selección, donde las fracciones positivas y negativas se retienen y se procesan o se someten a pasos de separación adicionales.

[0115] En ciertas realizaciones, las partículas que responden magnéticamente están recubiertas con anticuerpos primarios u otros pares de unión, anticuerpos secundarios, lectinas, enzimas o estreptavidina. En ciertas realizaciones, las partículas magnéticas se unen a las células mediante un recubrimiento de anticuerpos primarios específicos para uno o más marcadores. En ciertas realizaciones, las células, en lugar de las perlas, se marcan con un anticuerpo primario o un par de unión, y luego se añaden partículas magnéticas recubiertas de anticuerpo secundario específico de tipo celular u otro par de unión (p. ej., estreptavidina). En ciertas realizaciones, las partículas magnéticas recubiertas con estreptavidina se usan junto con anticuerpos biotinilados primarios o secundarios.

[0116] En algunas realizaciones, las partículas que responden magnéticamente se dejan unidas a las células que se incubarán, cultivarán y/o manipularán posteriormente; en algunos aspectos, las partículas se dejan unidas a las células para la administración a un paciente. En algunas realizaciones, las partículas magnetizables o que responden magnéticamente se eliminan de las células. Los métodos para eliminar partículas magnetizables de las células son conocidos e incluyen, p. ej., el uso de anticuerpos no marcados competitivos, partículas magnetizables o anticuerpos conjugados con conectores escindibles, etc. En algunas realizaciones, las partículas magnetizables son biodegradables.

[0117] En algunas realizaciones, la selección basada en afinidad se realiza mediante clasificación celular activada magnéticamente (MACS) (Miltenyi Biotech, Auburn, CA). Los sistemas de clasificación de células activadas magnéticamente (MACS) son capaces de seleccionar células de alta pureza que tienen partículas magnetizadas unidas a las mismas. En ciertas realizaciones, 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 unidas a partículas magnetizadas se mantienen en su lugar mientras se eluyen las especies no unidas. Luego, después de completar este primer paso de elución, las especies que quedaron atrapadas en el campo magnético y se les impidió eluir de alguna manera para que puedan eluirse y recuperarse. En ciertas realizaciones, las células no diana se marcan y agotan de la población heterogénea de células.

[0118] En algunas realizaciones, la selección basada en afinidad emplea Streptamers®, que son perlas magnéticas, tales como nanopérlas o micropérlas, por ejemplo 1-2 µm que, en algunos aspectos, se conjugan con un reactivo de inmunofinidad asociado de unión, tal como un anticuerpo a través de un mutante de estreptavidina, p. ej., Strep-Tactin® o Strep-Tactin XT® (véase, p. ej., la Patente de Estados Unidos Nº 6,103,493, Solicitudes PCT publicadas internacionales N^{os} WO/2013011011, WO 2014/076277). En algunas realizaciones, el mutante de estreptavidina se funcionaliza, se recubre y/o se inmoviliza en la perla.

[0119] En algunas realizaciones, el mutante de estreptavidina exhibe una mayor afinidad de unión por un ligando peptídico que contiene la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NO:1-6, como por ejemplo SEQ ID NO: 5 y/o SEQ ID NO: 6 (por ejemplo II® Strep-tag), de una estreptavidina tipo no modificado o salvaje, tal como una estreptavidina tipo no modificado o salvaje expuesta en la SEQ ID NO:11 o SEQ ID NO:14. En algunas realizaciones, el mutante de estreptavidina exhibe una afinidad de unión como una constante de afinidad por dichos péptidos que es mayor que la afinidad de unión de estreptavidina de tipo salvaje por el mismo péptido en más de 5 veces, 10 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces o mayor.

[0120] La muteína de estreptavidina contiene una o más diferencias de aminoácidos en comparación con una estreptavidina no modificada, tal como una estreptavidina de tipo salvaje o un fragmento de la misma. El término "estreptavidina no modificada" se refiere a un polipéptido de partida al que se le realizan una o más modificaciones. En algunas realizaciones, el polipéptido de partida o no modificado puede ser un polipéptido de tipo salvaje expuesto en SEQ ID NO:11. En algunas realizaciones, la estreptavidina no modificada es un fragmento de estreptavidina de tipo salvaje, que se acorta en el extremo N y/o C-terminal. Dichas estreptavidinas mínimas incluyen cualquiera que comience N-terminalmente en la región de las posiciones de aminoácidos 10 a 16 de SEQ ID NO:11 y termine C-terminalmente en la región de las posiciones de aminoácidos 133 a 142 de SEQ ID NO:11. En algunas realizaciones, la estreptavidina no modificada tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:14. En algunas realizaciones, la estreptavidina no modificada, tal como se establece en SEQ ID NO:14, puede contener además una metionina N-terminal en una posición correspondiente a Ala13 con la numeración como se establece en SEQ ID NO:11. Referencia al número de residuos en estreptavidina proporcionada en este documento es con referencia a la numeración de residuos en la SEQ ID NO:11.

[0121] El término "muteína de estreptavidina", "mutante de estreptavidina" o variaciones de la misma, se refiere a una proteína de estreptavidina que contiene una o más diferencias de aminoácidos en comparación con una estreptavidina no modificada o de tipo salvaje, tal como una estreptavidina establecida en la SEQ ID NO:11 o SEQ ID NO:14. La una o más diferencias de aminoácidos pueden ser mutaciones de aminoácidos, tales como uno o más reemplazos de aminoácidos (sustituciones), inserciones o deleciones. En algunas realizaciones, una muteína de estreptavidina puede tener al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 diferencias de aminoácidos en comparación con un tipo salvaje o estreptavidina no modificada. En algunas realizaciones, los reemplazos de aminoácidos (sustituciones) son mutaciones conservativas o no conservativas. La muteína de estreptavidina que contiene una o más diferencias de aminoácidos exhibe una afinidad de unión como una constante de afinidad que es mayor que $2,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ para el ligando peptídico (Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly; también llamado Strep-tag®, establecido en SEQ ID NO: 5). En algunas realizaciones, el mutante de estreptavidina exhibe una afinidad de unión como una constante de afinidad que es mayor que $1,4 \times 10^4 \text{ m}^{-1}$ para el ligando peptídico (Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys; también llamado Strep-tag® II, establecido en SEQ ID NO: 6). En algunas realizaciones, la afinidad de unión puede determinarse mediante métodos conocidos en la técnica, tales como cualquiera de los descritos a continuación.

[0122] En algunas realizaciones, la muteína de estreptavidina contiene una mutación en uno o más residuos 44, 45, 46, y/o 47. En algunas formas de realización, el mutante de estreptavidina contiene residuos Val44 de-Thr45-Ala46-Arg47, como se expone en muteínas de estreptavidina ejemplares expuestas en SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:15. En algunas realizaciones, la muteína de estreptavidina contiene residuos Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47, tal como se expone en las muteínas de estreptavidina ejemplares expuestas en SEQ ID NO:13 o 16. En algunas realizaciones, la muteína de estreptavidina exhibe la secuencia de aminoácidos establecidos en SEQ ID NO: 12, 13, 15 o 16, o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:12, 13, 15 o 16, y exhibe una afinidad de unión que es mayor que $2,7 \times 10^4 \text{ m}^{-1}$ para el ligando peptídico (Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly; también llamado Strep-tag®, establecido en SEQ ID NO: 5) y/o mayor que $1,4 \times 10^4 \text{ m}^{-1}$ para el ligando peptídico (Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys; también llamado Strep-tag® II, establecido en SEQ ID NO: 6).

[0123] En alguna realización, la muteína de estreptavidina es un mutante como se describe en la Solicitud PCT publicada internacional. N^{os} WO 2014/076277. En algunas realizaciones, la muteína de estreptavidina contiene al menos dos residuos de cisteína en la región de las posiciones de aminoácidos 44 a 53 con referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en la SEQ ID NO:11. En algunas realizaciones, los residuos de cisteína están presentes en las posiciones 45 y 52 para crear un puente disulfuro que une estos aminoácidos. En tal realización, el aminoácido 44 es típicamente glicina o alanina y el aminoácido 46 es típicamente alanina o glicina y el aminoácido 47 es típicamente arginina. En algunas realizaciones, la muteína de estreptavidina contiene al menos una mutación o diferencia de aminoácidos en la región de los residuos de aminoácidos 115 a 121 con referencia a las posiciones de aminoácidos expuestas en la SEQ ID NO:11. En algunas realizaciones, la muteína de estreptavidina contiene al menos una mutación en el aminoácido de posición 117, 120 y 121 y/o una deleción de los aminoácidos 118 y 119 y la sustitución de al menos la posición de aminoácido 121.

[0124] En algunas realizaciones, una muteína de estreptavidina puede contener cualquiera de las mutaciones anteriores en cualquier combinación, siempre que la muteína de estreptavidina resultante muestre una afinidad de unión mayor que $2,7 \times 10^4 \text{ m}^{-1}$ por el ligando peptídico (Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly; también llamado Strep-tag®, establecido en SEQ ID NO: 5) y/o mayor que $1,4 \times 10^4 \text{ m}^{-1}$ para el ligando peptídico (Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys; también llamado Strep-tag® II, expuesto en SEQ ID NO: 6).

[0125] En algunas realizaciones, la afinidad de unión de un mutante de estreptavidina por un reactivo de unión a ligando péptido es mayor que $5 \times 10^4 \text{ m}^{-1}$, $1 \times 10^5 \text{ m}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ m}^{-1}$, $1 \times 10^6 \text{ m}^{-1}$, $5 \times 10^6 \text{ m}^{-1}$ o $1 \times 10^7 \text{ m}^{-1}$, pero generalmente es menor que $1 \times 10^{13} \text{ m}^{-1}$, $1 \times 10^{12} \text{ m}^{-1}$ o $1 \times 10^{11} \text{ m}^{-1}$.

[0126] En algunas realizaciones, el mutante de estreptavidina también exhibe unión a otros ligandos de estreptavidina, tales como, pero no limitado a, biotina, iminobiotina, ácido lipoico, destiobiotina, diaminobiotin, HABA (ácido hidroxiazobenceno-benzoico) y/o dimetilo-HABA. En algunas realizaciones, las muteínas de estreptavidina exhiben una afinidad de unión por otro ligando de estreptavidina, como biotina o destiobiotina, que es mayor que la afinidad de unión de la muteína de estreptavidina por el ligando peptídico (Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly; también llamado Strep-tag®, establecido en SEQ ID NO: 5) o el ligando peptídico (Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys; también llamado Strep-tag® II, establecido en SEQ ID NO: 6).

[0127] En algunas realizaciones, la muteína de estreptavidina es un multímero. Los multímeros se pueden generar utilizando cualquier método conocido en la técnica, como cualquiera de los descritos en la Solicitud de Patente de Estados Unidos publicada N^o US2004/0082012. En algunas realizaciones, los oligómeros o polímeros de muteínas pueden prepararse mediante la introducción de residuos de carboxilo en un polisacárido, p. ej., dextrano. En algunos aspectos, las muteínas de estreptavidina se acoplan a través de grupos amino primarios de residuos de Lisina internos y/o el extremo N libre a los grupos carboxilo en el esqueleto de dextrano usando química convencional de carbodiimida en un segundo paso. En algunas realizaciones, la reacción de acoplamiento se realiza en una relación molar de aproximadamente 60 moles de estreptavidina mutante por mol de dextrano. En algunas realizaciones, los oligómeros o polímeros también se pueden obtener mediante reticulación a través de enlaces bifuncionales, tales como

glutarialdehído o por otros métodos conocidos en la técnica.

[0128] En algunos aspectos, un cordón de inmunoafinidad, tal como un Streptamer® u otro cordón de inmunoafinidad, puede contener un anticuerpo producido por o derivado de un hibridoma como sigue: OKT3 (α CD3), 13B8,2 (α CD4), OKT8 (α CD8), FRT5 (α CD25), DREG56 (α CD62L), MEM56 (α CD45RA). En algunas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos anteriores puede contener una o más mutaciones en el marco de las regiones variables de la cadena pesada y ligera sin dirigirse a las regiones CDR altamente variables. Ejemplos de tales anticuerpos incluyen, en algunos aspectos, anticuerpos anti-CD4 como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 7,482.000 y Bes et al. (2003) J. Biol. Chem., 278:14265-14273. En algunas realizaciones, se puede generar un fragmento de unión a antígeno, tal como un fragmento Fab, a partir de tales anticuerpos usando métodos conocidos en la técnica, tales como, en algunos aspectos, amplificación de secuencias hipervariables de cadenas pesadas y ligeras y clonación para permitir la combinación con secuencias que codifican un dominio constante apropiado. En algunas realizaciones, el dominio constante es de la subclase humana IgG1/ κ . Dichos anticuerpos se pueden fusionar carboxiterminalmente con una molécula de unión a estreptavidina peptídica, tal como se establece en la SEQ ID NO:10. Ejemplos de tales anticuerpos se describen en Stemmer et al. (2102) PLoS One, 7: 35798 y solicitud internacional PCT N° WO2013/011011.

[0129] En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une específicamente a un marcador de la superficie celular asociada o recubierta con una perla u otra superficie es un anticuerpo de longitud completa o es un fragmento de unión a antígeno del mismo, que incluye fragmentos (Fab), fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fab', fragmentos Fv, regiones de cadena pesada variable (V_H) capaces de unirse específicamente al antígeno, fragmentos de anticuerpos de cadena sencilla, incluidos fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) y fragmentos de anticuerpos de dominio único (p. ej., SdAb, sdFv, nanocuerpo). En algunas realizaciones, el anticuerpo es un fragmento Fab. En algunas realizaciones, el anticuerpo puede ser monovalente, bivalente o multivalente. En algunas realizaciones, el anticuerpo, tal como un Fab, es un multímero. En algunas realizaciones, el anticuerpo, tal como un multímero Fab, forma un complejo multivalente con el marcador de la superficie celular.

[0130] En algunas realizaciones, el anticuerpo, tal como un Fab, asociado con un Streptamer exhibe una medida cinética particular de afinidad de unión (p. ej., constante de disociación, K_D, constante de asociación K_A, tasa de desviación u otro parámetro cinético de afinidad de unión). Dichas mediciones pueden determinarse usando cualquier ensayo de unión conocido por un experto en la materia. En ejemplos particulares, se utiliza una tecnología de biosensor basada en afinidad como una medida de afinidad de unión. Las tecnologías de biosensores ejemplares incluyen, p. ej., Biacore Technologies, BioRad ProteOn, Reichert, GWC Technologies, IBIS SPIR Imaging, Nomadics SensiQ, Akubio RAPid, ForteBio Octet, IAsys, Nanofilm y otros (ver, p. ej., RiCHet al. (2009) Analytical Biochemistry, 386:194-216). En algunas realizaciones, la afinidad de unión se determina mediante titulación de fluorescencia o calorimetría de titulación.

[0131] En algunas realizaciones, el anticuerpo, tal como un Fab, exhibe una velocidad k_{off} (también llamada constante de velocidad de disociación) para la unión a un marcador de superficie celular en una célula que es mayor que aproximadamente 0,5 X 10⁻⁴ sec⁻¹, aproximadamente 1 X 10⁻⁴ sec⁻¹, aproximadamente 2 X 10⁻⁴ sec⁻¹, aproximadamente 3 X 10⁻⁴ sec⁻¹, aproximadamente 4 X 10⁻⁴ sec⁻¹, aproximadamente 5 X 10⁻⁴ sec⁻¹, aproximadamente 1 X 10⁻³ sec⁻¹, aproximadamente 1,5 X 10⁻³ sec⁻¹, aproximadamente 2 X 10⁻³ sec⁻¹, aproximadamente 3 X 10⁻³ sec⁻¹, aproximadamente 4 X 10⁻³ sec⁻¹, aproximadamente 5 X 10⁻³ sec⁻¹, aproximadamente 1 X 10⁻² sec⁻¹ o aproximadamente 5 X 10⁻¹ sec⁻¹ o más. La velocidad particular de k_{off} puede determinar la velocidad a la que el reactivo de anticuerpo puede disociarse de su interacción con una célula a través de su unión a un marcador de superficie celular (véase, p. ej., la solicitud PCT internacional publicada N° WO/2013011011). Por ejemplo, en algunos aspectos, el rango k_{off} se puede elegir dentro de un rango, dependiendo, p. ej., de la aplicación particular o el uso de una célula seleccionada o enriquecida, incluidos factores como el deseo delimitar el anticuerpo unido de la célula superficie, el tiempo de las células en cultivo o incubación, la sensibilidad a la célula y otros factores. En una realización, un anticuerpo tiene una alta tasa de k_{off}, p. ej., mayor de 4,0 X 10⁻⁴ sec⁻¹, de modo que, después de la interrupción de los complejos de unión multivalentes, la mayoría del anticuerpo puede eliminarse en una hora, dado que, en algunos aspectos, teniendo en cuenta la vida media T_{1/2} del complejo, en 56 minutos la concentración de los complejos se reduce al 25% de la concentración original, suponiendo que los efectos de la unión pueden descuidarse debido a una dilución suficiente). En otra realización, un anticuerpo con una tasa de k_{off} más baja de, p. ej., 1,0 X 10⁻⁴ sec⁻¹, la disociación puede tomar más tiempo, por ejemplo aproximadamente o alrededor de 212 min o aproximadamente 3 horas y media para eliminar el 75% del anticuerpo de la superficie.

[0132] En algunas realizaciones, el anticuerpo, tal como un Fab, exhibe una constante de disociación (K_a) para la unión a un marcador de superficie celular en una célula que puede estar en el rango de aproximadamente 10⁻² M a aproximadamente 10⁻⁸ M, o de aproximadamente 10⁻² M a aproximadamente 10⁻⁹ M, o de aproximadamente 10⁻² M a aproximadamente 0,8 X 10⁻⁹ M, o de aproximadamente 10⁻² M a aproximadamente 0,6 X 10⁻⁹ M, o de aproximadamente 10⁻² M a aproximadamente 0,4 X 10⁻⁹ M, o de aproximadamente 10⁻² M a aproximadamente 0,3 X 10⁻⁹ M, o de aproximadamente 10⁻² M a aproximadamente 0,2 X 10⁻⁹, o de aproximadamente 10⁻² M a aproximadamente 0,15 X 10⁻⁹ M, o de aproximadamente 10⁻² a aproximadamente 10⁻¹⁰, en algunas realizaciones, la constante de disociación (K_a) para la unión de un marcador de superficie celular en una célula puede estar en el intervalo de aproximadamente 10⁻⁷ M a aproximadamente 10⁻¹⁰ M, o de aproximadamente 10⁻⁷ M a aproximadamente

0,8 X 10⁻⁹ M, o de aproximadamente 10⁻⁷ M a aproximadamente 0,6 X 10⁻⁹ M, de aproximadamente 10⁻⁷ M a aproximadamente 0,3 X 10⁻⁹ M, de 1,1 X 10⁻⁷ M a aproximadamente 10⁻¹⁰ M, o de aproximadamente 1,1 X 10⁻⁷ M a aproximadamente 0,15 X 10⁻⁹ M, o de aproximadamente 1,1 X 10⁻⁷ M a aproximadamente 0,3 X 10⁻⁹ M, o de aproximadamente 1,1 X 10⁻⁷ M a aproximadamente 0,6 X 10⁻⁹ M, o de aproximadamente 1,1 X 10⁻⁷ M a aproximadamente 0,8 X 10⁻⁹ M.

[0133] En algunas realizaciones, el reactivo de inmunoafinidad, tal como anticuerpo, por ejemplo un Fab, está unido, directamente o indirectamente, a un ligando peptídico, tal como un ligando peptídico capaz de unirse a un mutante de estreptavidina (véase, p. ej., la Patente de Estados Unidos N° 5,506,121). En algunas realizaciones, como el péptido contiene la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NO:1-6. En algunas realizaciones, el reactivo de inmunoafinidad, tal como un anticuerpo, por ejemplo un Fab, está unido, directamente o indirectamente, a un ligando peptídico que contiene la secuencia de aminoácidos establecidos en SEQ ID NO: 6.

[0134] En algunas realizaciones, el reactivo de inmunoafinidad, como el anticuerpo, por ejemplo un Fab, se fusiona directa o indirectamente con una secuencia peptídica que contiene una disposición secuencial de al menos dos módulos de unión a estreptavidina, en donde la distancia entre los dos módulos es al menos 0 y no mayor de 50 aminoácidos, en donde un módulo de unión tiene de 3 a 8 aminoácidos y contiene al menos la secuencia His-Pro-Xaa (SEQ ID NO:1), donde Xaa es glutamina, asparagina o metionina, y en donde el otro módulo de unión tiene la secuencia del mismo o diferente ligando de péptido de estreptavidina, tal como se establece en la SEQ ID NO: 3 (véase, p. ej., la Solicitud PCT publicada internacional N° WO02/077018; Patente de Estados Unidos N° 7,981,632). En algunas realizaciones, el ligando peptídico fusionado, directa o indirectamente, al reactivo de inmunoafinidad, tal como anticuerpo, por ejemplo Fab, contiene una secuencia que tiene la fórmula establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 7 u 8. En algunas realizaciones, el ligando peptídico tiene la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 9, 10 o 17-19.

[0135] Alternativamente, se pueden usar otros péptidos de unión a estreptavidina conocidos en la técnica, p. ej., según lo descrito por Wilson et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 98 (2001), 3750-3755). En algunas realizaciones, el péptido se fusiona con el N- y/o C-extremo de la proteína.

[0136] En algunas realizaciones, el anticuerpo, tal como un Fab, fusionado a un ligando peptídico capaz de unirse a un mutante de estreptavidina, se pone en contacto con perlas que contienen mutante de estreptavidina para recubrir las perlas con anticuerpo. En algunas realizaciones, las perlas recubiertas pueden usarse en métodos de enriquecimiento y selección como se describe en el presente documento poniendo en contacto tales perlas con una muestra que contiene células para enriquecer o seleccionar.

[0137] En algunas realizaciones, el enlace entre el par de unión al ligando peptídico y el reactivo de unión a muteína de estreptavidina es reversible. En algunas realizaciones, el enlace entre el par de unión al ligando peptídico y el reactivo de unión a muteína de estreptavidina es alto, tal como se describió anteriormente, pero es menor que la afinidad de unión del reactivo de unión a estreptavidina por biotina o un análogo de biotina. Por lo tanto, en algunas realizaciones, se puede agregar biotina (vitamina H) o un análogo de biotina para competir por la unión para interrumpir la interacción de unión entre el reactivo de unión a muteína de estreptavidina en la perla y el par de unión al ligando peptídico asociado con el anticuerpo específicamente unido a un marcador celular en la superficie. En algunas realizaciones, la interacción se puede revertir en presencia de bajas concentraciones de biotina o análogo, como en presencia de 0,1 mM a 10 mM, 0,5 mM a 5 mM o 1 mM a 3 mM, como generalmente al menos o aproximadamente al menos 1 mM o al menos 2 mM, por ejemplo a aproximadamente 2,5 mM. En algunas realizaciones, la incubación en presencia de un agente de la competencia, como una biotina o un análogo de biotina, libera la perla de la célula seleccionada.

b. Cromatografía de inmunoafinidad

[0138] En algunas realizaciones, la selección basada en afinidad emplea la cromatografía de inmunoafinidad. Los métodos de cromatografía de inmunoafinidad incluyen, en algunos aspectos, una o más matrices de cromatografía como se describe en la solicitud de patente publicada de los Estados Unidos N° US2015/0024411. En algunas realizaciones, el método cromatográfico es una cromatografía de fluidos, típicamente una cromatografía líquida. En algunas realizaciones, la cromatografía se puede llevar a cabo en un modo de flujo continuo en donde se aplica una muestra de fluido que contiene las células a aislar, p. ej., por flujo de gravedad o por una bomba en un extremo de una columna que contiene la matriz de cromatografía y en donde la muestra de fluido sale de la columna en el otro extremo de la columna. Además, en algunos aspectos, la cromatografía puede llevarse a cabo en un modo "arriba y abajo" en donde se aplica una muestra de fluido que contiene las células a ser aisladas, p. ej., mediante una pipeta en un extremo de una columna que contiene la cromatografía matriz empaquetada dentro de una punta de pipeta y en donde la muestra de fluido entra y sale de la matriz de cromatografía/punta de pipeta en el otro extremo de la columna. En algunas realizaciones, la cromatografía también se puede llevar a cabo en un modo discontinuo en donde el material de cromatografía (fase estacionaria) se incuba con la muestra que contiene las células, p. ej., bajo agitación, rotación o contacto repetido y extracción de la muestra de fluido., p. ej., por medio de una pipeta.

[0139] En algunas realizaciones, la matriz de cromatografía es una fase estacionaria. En algunas realizaciones, la

5 cromatografía es cromatografía en columna. En algunas realizaciones, se puede usar cualquier material de cromatografía adecuado. En algunas realizaciones, la matriz de cromatografía tiene la forma de una fase sólida o semisólida. En algunas realizaciones, la matriz de cromatografía puede incluir una resina polimérica u un óxido metálico u un óxido metaloide. En algunas realizaciones, la matriz de cromatografía es un material no magnético o material no magnetizable. En algunas realizaciones, la matriz de cromatografía es una sílice derivatizada o un gel reticulado, tal como en forma de un polímero natural, p. ej., un polisacárido. En algunas realizaciones, la matriz de cromatografía es un gel de agarosa. El gel de agarosa para usar en una matriz de cromatografía es conocido en la técnica e incluye, en algunos aspectos, agarosa Superflow™ o un material sepharose como Superflow™ sepharose®, que están disponibles comercialmente en diferentes tamaños de perlas y poros. En algunas realizaciones, la matriz de cromatografía es una matriz de agarosa reticulada particular a la que se une covalentemente el dextrano, como cualquiera conocido en la técnica, por ejemplo en algunos aspectos, Sephadex®, Superdex® o Sephacryl®, que están disponibles en diferentes tamaños de perlas y poros.

15 **[0140]** En algunas realizaciones, una matriz de cromatografía está hecha de un polímero sintético, tal como poliacrilamida, un gel de estireno-divinilbenceno, un copolímero de un acrilato y un diol o de una acrilamida y un diol, un copolímero de polisacáridos y agarosa, p. ej., un compuesto de poliacrilamida/agarosa, un polisacárido y N, N'-metilendibiscarilamida, o una sílice derivada acoplada a un polímero sintético o natural.

20 **[0141]** En algunas realizaciones, la matriz de cromatografía, tal como perlas de agarosa u otra matriz, tiene un tamaño de al menos o aproximadamente al menos 50 µm, 60 µm, 70 µm, 80 µm, 90 µm, 100 µm, 120 µm o 150 µm o más. El límite de exclusión de la matriz de cromatografía de exclusión por tamaño se selecciona para estar por debajo del ancho máximo de la célula objetivo en una muestra, p. ej., células T. En algunas realizaciones, el volumen de la matriz es al menos 0,5 µL, 1 µL, 1,5 µL, 2 µL, 3 µL, 4 µL, 5 µL, 6 µL, 7 µL, 8 µL, 9 µL, 10 µL o más. En algunas realizaciones, la matriz de cromatografía se empaqueta en una columna.

25 **[0142]** En algunas realizaciones, la matriz de cromatografía, que es una matriz de cromatografía de inmunoafinidad, incluye un reactivo de afinidad, tal como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, tal como Fab, inmovilizado a la misma. El anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno, tal como un Fab, puede ser cualquiera como se describió anteriormente, incluyendo, en algunos aspectos, anticuerpos conocidos en la técnica, anticuerpos que tienen una velocidad k^{off} particular y/o anticuerpos que tienen una constante de disociación particular (K_a).

30 **[0143]** En algunas realizaciones, el reactivo de afinidad, tal como anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, tal como un Fab, está inmovilizado. En algunas realizaciones, el reactivo de inmunoafinidad, tal como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, tal como un Fab, se fusiona o se une a un par de unión que interactúa con un reactivo de unión inmovilizado en la matriz. En algunas realizaciones, la capacidad de unión de la matriz de cromatografía es suficiente para adsorber o es capaz de adsorber al menos 1 X107 células/ml, 5 X107 células/ml, 1 X108 células/ml, 5 X108 células/ml, 1 X109 células/ml o más, en donde dichas células son células que expresan un marcador de superficie celular específicamente reconocido por el reactivo de afinidad, como un anticuerpo o Fab.

35 **[0144]** En algunas realizaciones, la interacción entre el reactivo de unión y el par de unión forma un enlace reversible, de modo que la unión del anticuerpo a la matriz es reversible. En algunas realizaciones, la unión reversible puede estar mediada por un par de unión mutante de estreptavidina y un reactivo de unión inmovilizado en la matriz que es estreptavidina, un análogo o muteína de estreptavidina, avidina o un análogo o muteína de avidina.

40 **[0145]** En algunas realizaciones, la unión reversible del reactivo de afinidad, tal como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, tal como Fab es a través de una interacción de reactivo y muteína de estreptavidina de unión a ligando de péptido, como se describe anteriormente con respecto a las perlas de inmunoafinidad. En aspectos de la matriz de cromatografía, la matriz, como las perlas de agarosa u otra matriz, se funcionaliza o se conjuga con una muteína de estreptavidina, como cualquiera de las descritas anteriormente, p. ej., cualquiera de las expuestas en SEQ ID NOS:12, 13, 15 o 16 En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, tal como un Fab, está fusionado o unido, directa o indirectamente, a un ligando peptídico capaz de unirse a un mutante de estreptavidina, como cualquiera de los descritos anteriormente. En algunas realizaciones, el ligando peptídico es cualquiera de los descritos anteriormente, tal como un péptido que contiene la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NO:1-10 o 17-19. En algunas realizaciones, la columna de matriz de cromatografía se pone en contacto con dicho reactivo de afinidad, tal como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, tal como un Fab para inmovilizar o unir reversiblemente el reactivo de afinidad a la columna.

45 **[0146]** En algunas realizaciones, la matriz de cromatografía de inmunoafinidad se puede utilizar en enriquecimiento y de selección de los métodos como se describe aquí mediante el contacto de dicha matriz con una muestra que contiene células para ser enriquecido o seleccionado. En algunas realizaciones, las células seleccionadas se eluyen o liberan de la matriz al interrumpir la interacción de el par de unión/reactivo de unión. En algunas realizaciones, el par de unión/reactivos de unión está mediada por un ligando peptídico y una interacción mutante de estreptavidina, y la liberación o las células seleccionadas pueden efectuarse debido a la presencia de un enlace reversible. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el enlace entre el par de unión al ligando peptídico y el reactivo de unión a muteína de estreptavidina es alto, como se describe anteriormente, pero es menor que la afinidad de unión del reactivo de unión a estreptavidina por biotina o un análogo de biotina. Por lo tanto, en algunas realizaciones, se puede agregar biotina

(vitamina H) o un análogo de biotina para competir por la unión para interrumpir la interacción de unión entre el reactivo de unión a muteína de estreptavidina en la matriz y el par de unión al ligando peptídico asociado con el anticuerpo específicamente unido a un marcador celular en la superficie. En algunas realizaciones, la interacción se puede revertir en presencia de bajas concentraciones de biotina o análogo, como en presencia de 0,1 mM a 10 mM, 0,5 mM a 5 mM o 1 mM a 3 mM, como generalmente al menos o aproximadamente al menos 1 mM o al menos 2 mM, por ejemplo a aproximadamente 2,5 mM. En algunas realizaciones, la elución en presencia de un agente de la competencia, como una biotina o un análogo de biotina, libera la célula seleccionada de la matriz.

[0147] En algunas realizaciones, la cromatografía de inmunoafinidad en los métodos proporcionados se realiza utilizando al menos dos columnas de matriz de cromatografía que están operativamente conectadas, por lo que una afinidad o agente de unión a uno de CD4 o CD8, como un anticuerpo, p. ej., un Fab, es acoplado a una primera matriz de cromatografía en una primera columna de selección y una afinidad o agente de unión al otro de CD4 o CD8, tal como un anticuerpo, por ejemplo un Fab, está acoplada a una segunda matriz de cromatografía en una segunda columna de selección. En algunas realizaciones, las al menos dos columnas de matriz de cromatografía están presentes en un sistema o aparato cerrado, tal como un sistema o aparato cerrado que es estéril.

[0148] En algunas realizaciones, también se proporciona en el presente documento un sistema o aparato cerrado que contiene al menos dos columnas de matriz de cromatografía que están operativamente conectadas, por lo que una afinidad o agente de unión a uno de CD4 o CD8, tal como un anticuerpo, p. ej., un Fab, está acoplado a una primera matriz de cromatografía en una primera columna de selección y una afinidad o agente de unión al otro de CD4 o CD8, como un anticuerpo, p. ej., un Fab, está acoplada a una segunda matriz de cromatografía en una segunda columna de selección. Ejemplos de tales sistemas y métodos se representan en la Figura 1A y la Figura 1B, y en los Ejemplos.

[0149] En algunas realizaciones, el sistema cerrado está automatizado. En algunas realizaciones, los componentes asociados con el sistema pueden incluir un microordenador integrado, bomba peristáltica y varias válvulas, como válvulas de presión o llaves de paso, para controlar el flujo de fluido entre las diversas partes del sistema. La computadora integrada en algunos aspectos controla todos los componentes del instrumento y dirige al sistema a realizar procedimientos repetidos en una secuencia estandarizada. En algunas realizaciones, la bomba peristáltica controla la velocidad de flujo en todo el conjunto de tubos y, junto con las válvulas de presión, asegura el flujo controlado de tampón a través del sistema.

[0150] Con referencia a la Figura 1A y la Figura 1B, en algunas realizaciones, la primera matriz de afinidad **3** que contiene una primera afinidad o agente aglutinante en una primera columna de selección **1** está i) operativamente acoplada a la segunda matriz de afinidad **4** que contiene una segunda afinidad o agente de unión en una segunda columna de selección **2** a través de un tubo y una válvula **13**, de modo que las células que han pasado a través de la primera matriz de cromatografía de afinidad y que no están unidas a una primera afinidad o agente de unión a la misma pueden pasar a la segunda matriz de afinidad y ii) está operativamente acoplado a un recipiente de salida, tal como un recipiente de cultivo **12**, para recolectar células seleccionadas de la primera matriz de afinidad que se une a la primera afinidad o agente de unión al mismo, como después de la elución y liberación de dichas células de la primera matriz de afinidad. En algunas realizaciones, la segunda matriz de afinidad **4** que contiene una segunda afinidad o agente de unión en una segunda columna de selección **2** está también acoplada operativamente a la salida de recipiente, tal como un recipiente de cultivo **12**, para recoger las células seleccionadas de la segunda matriz de afinidad que une a la segunda afinidad o agente de unión sobre la misma, tal como después de la elución y liberación de dichas células desde la segunda matriz de afinidad. En algunas realizaciones, la segunda columna de selección **2** está operativamente conectada al recipiente de salida, tal como el recipiente de cultivo **12**, a través de una cámara de retirada **9** que contiene un reactivo de unión, tal como un mutante de estreptavidina, que puede unirse con alta afinidad, tal como mayor de 10^{-10} M^{-1} , a un reactivo de elución, como la biotina.

[0151] En algunas realizaciones, el tamaño, p. ej., longitud y/o diámetro, de la primera columna de selección **1** y la segunda columna de selección **2** puede ser igual o diferente. En algunas realizaciones, el tamaño, p. ej., longitud y/o diámetro, de una de la primera columna **1** o segunda columna **2** es mayor que el tamaño de la otra de las columnas al menos 1,2 veces, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 5 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces o más.

[0152] En algunas realizaciones, la primera matriz de afinidad **3** que contiene una primera afinidad o agente de unión en una primera columna de selección **1** también está operativamente conectada a una tercera matriz de afinidad **17** que contiene una tercera afinidad o agente de unión en una tercera columna de selección **15** a través de un tubo y una válvula **13**, de modo que las células seleccionadas de la primera matriz de afinidad que se unen a la primera afinidad o agente de unión a la misma pueden pasar a la tercera matriz de afinidad, tal como después de la elución y liberación de dichas células desde la primera matriz de afinidad. En algunas realizaciones, la primera columna de selección **1** está operativamente conectada a la tercera columna de selección **15** a través de una cámara de retirada **9** que contiene un reactivo de unión, tal como un mutante de estreptavidina, que puede unirse con alta afinidad, tal como más de 10^{-10} M^{-1} , a un reactivo de elución, como la biotina. En algunas realizaciones, la matriz de afinidad tercera **17** que contiene un tercio de afinidad o agente de unión en una columna de selección tercera **15** también está acoplado operativamente al recipiente de salida, tal como un recipiente de cultivo **12**, para recoger las células seleccionadas de la tercera matriz de afinidad que tiene unido a la tercera afinidad o agente de unión sobre la misma (y que se haya

unido previamente a la primera afinidad o agente de unión), tal como después de la elución y liberación de tales células desde la tercera matriz de afinidad (y previamente desde la primera matriz de afinidad). En algunas realizaciones, la tercera columna de selección **15** está operativamente conectada al recipiente de salida, tal como el recipiente de cultivo **12**, a través de una cámara de retirada **9** que contiene un reactivo de unión, tal como un mutante de estreptavidina, que puede unirse con alta afinidad, tal como mayor que 10^{-10} m^{-1} , a un reactivo de elución, tal como biotina.

[0153] En algunas realizaciones, el tamaño, p. ej., longitud y/o diámetro, de la primera columna de selección **1** y la tercera columna de selección **15** puede ser igual o diferente. En algunas realizaciones, el tamaño, p. ej., longitud y/o diámetro, de una de la primera columna **1** o tercera columna **15** es mayor que el tamaño de la otra de las columnas al menos 1,2 veces, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 5 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces o más.

[0154] En algunas realizaciones, la primera columna de selección **1** está acoplada operativamente a un depósito de almacenamiento que contiene la muestra de células **5**, tal como a través de tubos, válvulas y una bomba **8**, para proporcionar una muestra de células en la primera columna de selección.

[0155] En algunas realizaciones, la primera columna de selección **1** también está operativamente acoplada a un depósito de lavado **6** que contiene tampón de lavado y/o un depósito de elución **7** que contiene un eluyente, tal como a través de tubos y válvulas, para permitir el paso de un tampón de lavado o un tampón de de elución, respectivamente, en la primera matriz de cromatografía en la primera columna de selección. En algunas realizaciones, debido a la conexión operable entre la primera y la segunda columna de selección, el tampón de lavado y/o el tampón de de elución pueden pasar operativamente a la segunda columna. En algunas realizaciones, debido a la conexión operable entre la primera y la tercera columna de selección, el tampón de lavado y/o el tampón de de elución pueden pasar operativamente a la tercera columna de selección.

[0156] En algunas realizaciones, la segunda columna de selección **2** también está operativamente acoplada a un depósito de lavado **6** que contiene tampón de lavado y/o un depósito de elución **7** que contiene un eluyente, tal como a través de tubos y válvulas, para permitir el paso de un tampón de lavado o un tampón de de elución, respectivamente, en la primera matriz de cromatografía en la primera columna de selección.

[0157] El tampón de lavado puede ser cualquier tampón fisiológico que sea compatible con las células, tal como solución salina tamponada con fosfato. En algunas realizaciones, el tampón de lavado contiene albúmina de suero bovino, albúmina de suero humano o albúmina de suero humano recombinante, tal como a una concentración de 0,1% a 5% o de 0,2% a 1%, tal como o aproximadamente 0,5%. En algunas realizaciones, el eluyente es biotina o un análogo de biotina, tal como desbiotina, por ejemplo en una cantidad que es o es al menos aproximadamente 0,5 mM, 1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 2,5 mM, 3 mM, 4 mM, o 5 mM.

[0158] En algunas realizaciones, la primera matriz de afinidad **3** en la primera columna de selección **1** está operativamente conectada a través de tubos y válvulas a un primer depósito de reactivo de afinidad (p. ej. Depósito Fab) **18** que contiene la primera afinidad o agente de unión, tal como un anticuerpo, p. ej., un Fab, tal como para la inmovilización en la primera matriz de afinidad. En algunas realizaciones, la segunda matriz de afinidad **4** en la segunda columna **2** está operativamente conectada a través de tubos y válvulas a un segundo depósito de afinidad o agente de unión (p. ej., un depósito Fab) **19** que contiene la segunda afinidad o agente de unión, como un anticuerpo, p. ej., un Fab, como para la inmovilización en la segunda matriz de afinidad. En algunas realizaciones, la tercera matriz de afinidad **17** en la tercera columna de selección **15** está operativamente conectada a través de tubos y válvulas a un tercer reservorio de afinidad o agente de unión (p. ej., reservorio Fab) **20** que contiene la tercera afinidad o agente de unión, tal como un anticuerpo, por ejemplo un Fab, como para la inmovilización en la segunda matriz de afinidad.

[0159] En algunas realizaciones, el primer y/o segundo reactivo de afinidad se une específicamente a CD4 o CD8, donde el primer y segundo reactivo de afinidad no son iguales. En algunas realizaciones, el tercer reactivo de afinidad se une específicamente a un marcador en células T ingenuas, en reposo o de memoria central o se une específicamente a un marcador que es CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD27 y/o CD127.

5. Enriquecimientos y proporciones de composiciones generadas

[0160] En algunas realizaciones, realizar una primera y segunda selección usando los métodos descritos anteriormente enriquece a partir de una muestra una primera población de células que expresan un primer marcador de superficie celular y una segunda población de células que expresan un segundo marcador de superficie celular, respectivamente. En ejemplos particulares, la primera y/o segunda población de células enriquecidas puede ser una población de células enriquecidas para células CD4⁺, y la otra de la población enriquecida de células, es decir, la otra de la primera o segunda población de células, puede ser un población enriquecida para CD8⁺. Como se describió anteriormente, en alguna realización, se puede realizar una tercera, cuarta o posterior selección para enriquecer para una subpoblación adicional de células de una población de células previamente enriquecida en el primer, segundo o subsiguientes enriquecimientos, como una subpoblación de células CD4⁺ y/o una subpoblación de células CD8⁺.

[0161] En algunas realizaciones, el método produce una composición enriquecida de células que contienen la primera

y segunda población de células enriquecidas, tal como una población de células enriquecidas para células CD4⁺ y una población de células enriquecidas para células CD8⁺. En algunas realizaciones, la composición enriquecida de células se designa una composición de iniciación de cultivo y se usa en etapas de procesamiento posteriores, tales como etapas de procesamiento posteriores que implican incubación, estimulación, activación, ingeniería y/o formulación de las células enriquecidas. En algunas realizaciones, posteriores a los pasos de procesamiento adicionales, tales como los pasos de procesamiento que implican incubación, estimulación, activación, ingeniería y/o formulación, y se genera una composición de salida que, en algunos aspectos, puede contener células genéticamente modificadas que contienen células CD4⁺ y células CD8⁺ que expresan un receptor de antígeno genéticamente modificado.

[0162] En algunas realizaciones, las composiciones enriquecidas de células son células enriquecidas de una muestra inicial como se describe anteriormente, en donde el número de células en la muestra inicial es al menos mayor que el número deseado de células en una composición enriquecida, como una composición de iniciación de cultivo. En algunas realizaciones, el número de células en la muestra inicial es mayor en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 500%, 1000%, 5000% o más mayor que el número deseado de células en la composición enriquecida. En algunos ejemplos, el número deseado de células en la población enriquecida, incluidas las células CD4⁺ enriquecidas, las células CD8⁺ o las subpoblaciones de las mismas, es al menos 1 X 10⁶ células, 2 X 10⁶ células, 4 X 10⁶ células, 6 X 10⁶ células 8 X 10⁶ células, 1 X 10⁷ células, 2 X 10⁷ células, 4 X 10⁷ células, 6 X 10⁷ células, 8 X 10⁷ células, 1 X 10⁸ células, 2 X 10⁸ células, 4 X 10⁸ células, 6 X 10⁸ células, 8 X 10⁸ células, 1 X 10⁹ células o más. En algunas realizaciones, el número de células en la muestra inicial es al menos 1 X 10⁸ células, 5 X 10⁸ células, 1 X 10⁹ células, 2 X 10⁹ células, 3 X 10⁹ células, 4 X 10⁹ células, 5 X 10⁹ células, 6 X 10⁹ células, 7 X 10⁹ células, 8 X 10⁹ células, 9 X 10⁹ células, 1 X 10¹⁰ células o más.

[0163] En algunas realizaciones, el rendimiento de la primera y/o segunda población o subpoblación de la misma, en la composición enriquecida, es decir, el número de células enriquecidas en la población o subpoblación en comparación con el número de la misma población o la subpoblación de células en la muestra inicial es del 10% al 100%, como 20% a 80%, 20% a 60%, 20% a 40%, 40% a 80%, 40% a 60%, o 60%, a 80%. En algunas realizaciones, el rendimiento de la primera y/o segunda población de células o subpoblación de las mismas es inferior al 70%, inferior al 60%, inferior al 50%, inferior al 40%, inferior al 30% o inferior a 20%

[0164] En algunas realizaciones, la pureza de la primera y/o segunda población de células o subpoblación de células de la misma en la composición enriquecida, es decir, el porcentaje de células positivas para el marcador de superficie celular seleccionado frente a las células totales en la población de células enriquecidas, es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, y generalmente es al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más.

[0165] En algunas realizaciones, la composición enriquecida de células, tal como una composición de iniciación de cultivo, contiene una proporción de células CD4⁺ a células CD8⁺ en una proporción de iniciación de cultivo. La relación de iniciación de cultivo es la proporción o número de células en las que se incluyen dos tipos de células o poblaciones de células aisladas en una composición de iniciación de cultivo, diseñada para dar como resultado la proporción o dosis de salida deseada, p. ej., proporción o dosis para la administración a un paciente, o dentro de una tasa de error tolerada o diferencia del mismo, al completar la incubación y/o la etapa de ingeniería u otras etapas de procesamiento y/o al descongelar y/o justo antes de la administración a un sujeto. En realizaciones de los métodos proporcionados aquí, las selecciones primera y/o segunda, o selecciones para subpoblaciones de las mismas, se pueden realizar de una manera para dar como resultado una relación de iniciación de cultivo elegida. Ejemplos de tales métodos se describen a continuación y en los Ejemplos.

a. Relaciones y números de iniciación de cultivo

[0166] En algunas realizaciones, la relación de iniciación de cultivo de CD4⁺ o subpoblaciones de las mismas a células CD8⁺ o subpoblaciones de las mismas está comprendida entre aproximadamente 10:1 y aproximadamente 1:10, entre en o alrededor de 5:1 y alrededor de 1:5, o entre alrededor de 2:1 y alrededor de 1:2. En algunas realizaciones, la relación de iniciación de cultivo de células CD4⁺ o subpoblaciones de las mismas a células CD8⁺ o subpoblaciones de las mismas es de 1:1 o aproximadamente.

[0167] En algunas realizaciones, la relación iniciadora del cultivo de células CD4⁺ a CD8⁺, o subpoblaciones de las mismas, es diferente de la relación de células CD4⁺ a CD8⁺ o las subpoblaciones de las mismas en la muestra del sujeto. En algunas realizaciones, se informa que la relación de células T CD4⁺ a CD8⁺ en una muestra de sujetos, como una muestra de sangre, está entre 1:1 y 14:1 células CD4⁺: CD8⁺, y generalmente está entre aproximadamente 1,5:1 y aproximadamente 2,5:1 células CD4⁺: CD8⁺. En algunas realizaciones, la proporción de células T CD4⁺ a CD8⁺ en una muestra, como una muestra de sangre, es aproximadamente 2:1 CD4⁺: células CD8⁺. En algunas realizaciones, la proporción de células T CD4⁺ a CD8⁺ en una muestra, como un muestra de sangre, es aproximadamente 1:1. (Ver, p. ej., Amadori, A et al., Nature Med. 1:1279-1283, 1995; Chakravarti, A., Nature Med. 1:1240-1241, 1995; Clementi, M., et al., Hum. Genet. 105: 337-342, 1999.) En algunas realizaciones, una relación de sujeto es menor que 1:1 de células CD4⁺: CD8⁺. (Véase, p. ej., Muhonen, T. J Immunother Emphasis Tumor Immunol. 1994 enero; 15 (1): 67-73.). En algunas realizaciones, la relación iniciadora del cultivo de células CD4⁺ a CD8⁺ es al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 100%, al menos 125%, al menos 150, al menos 200%, al menos 300%, al menos 400% o al menos 500% mayor o

menor que la relación de células CD4⁺ a CD8⁺ en la muestra del sujeto.

[0168] En algunas realizaciones, antes de realizar la primera y/o segunda selección, se determina la relación de células T CD4⁺ a CD8⁺ en la muestra del sujeto. En función de la proporción particular de las células T CD4⁺ a CD8⁺ en el sujeto, que puede variar entre los sujetos, el modo particular de selección se puede individualizar al sujeto, p. ej., dimensionando las columnas de cromatografía o seleccionando la cantidad o concentración de reactivos de inmunofinidad, para lograr la relación iniciadora de cultivo deseada o elegida. El nivel relativo o la frecuencia de varias poblaciones celulares en un sujeto se puede determinar en base a la evaluación de la expresión superficial de un marcador o marcadores presentes en tales poblaciones o subpoblaciones. Se pueden usar varios métodos bien conocidos para evaluar el nivel de expresión de marcadores de superficie o proteínas, como la detección por métodos basados en afinidad, p. ej., métodos basados en inmunofinidad, p. ej., en el contexto de proteínas de superficie celular, como por citometría de flujo.

[0169] En algunos contextos, la proporción apropiada de iniciación de cultivo para tipos de células particulares puede variar dependiendo del contexto, p. ej., para una enfermedad, afección o tratamiento previo particular de un sujeto del que se derivan células, y/o una especificidad de antígeno particular de las células, representación relativa entre células de un tipo particular (p. ej., células T CD8⁺) de varias subpoblaciones, p. ej., células efectoras versus memoria versus células ingenuas, y/o una o más condiciones bajo las cuales las células estarán se incubaron, tal como medio, agentes estimulantes, tiempo de cultivo, tampones, dióxido de carbono contenido de oxígeno contenido, antígeno, citocinas, anticuerpos, y otros componentes. Por lo tanto, puede ser un tipo de célula que típicamente o en general se sabe que prolifera o se expande más rápidamente que otro no siempre tendrá esa propiedad en todos los contextos. Por lo tanto, en algunos aspectos, la relación de iniciación del cultivo se determina en función de las capacidades conocidas de los tipos de células en un contexto normal o típico, junto con la evaluación de los fenotipos o estados de las células o el sujeto del que se derivan las células, y/o evidencia empírica.

[0170] En algunas realizaciones, las relaciones de iniciación de cultivo se basan en el conocimiento de una o más de estas características para un tipo particular de célula que se sabe o se determina que está en la concentración. En algunas realizaciones, la proporción de células CD4⁺ a CD8⁺ en la composición iniciadora del cultivo es mayor o menor que 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces más o menos, respectivamente, que la relación de salida deseada de CD4⁺ a CD8⁺.

[0171] En algunas realizaciones, p. ej., se sabe que las células CD4⁺ en algunos contextos proliferan o se expanden en un grado menor o menos rápido en comparación con las células CD8⁺, cuando se incuban bajo ciertas condiciones estimulantes. Ver, p. ej., Foulds et al. (2002) J Immunol. 168 (4):1528-1532; Caggiari y col. (2001) Cytometry. 46 (4) 233-237; Hoffman y col. (2002) Transplantation. 74 (6): 836-845; y Rabenstein et al. (2014) J Immunol. Publicado en línea antes de imprimir el 17 de marzo de 2014, doi: 10.4049/jimmunol.1302725. Por lo tanto, en algunos ejemplos, la relación de células CD4⁺ a CD8⁺ en la composición iniciadora del cultivo es 10 veces o 100 veces la relación de salida deseada. Por ejemplo, si se desea una relación de salida CD4/CD8 1:1 (o 50%/50%), las poblaciones CD4⁺ y CD8⁺ pueden incluirse en un ejemplo en la composición iniciadora del cultivo en una relación de 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, 60:1, 70:1, 80:1, 90:1 o 100:1, p. ej., para tener en cuenta las diferencias en las tasas de expansión durante un período de tiempo particular. Dependiendo de las diferencias en las tasas o la expansión o proliferación de una de las células CD4⁺ o CD8⁺, o subpoblaciones de las mismas, de un otro, un artesano experto puede determinar empíricamente la relación de iniciación del cultivo para lograr una relación de salida deseada en condiciones particulares de estimulación o activación.

[0172] La relación de iniciación de cultivo no será necesariamente idéntica, o incluso aproximada, a la relación de salida deseada. Por ejemplo, si se desea administrar células T manipuladas CD4⁺ y CD8⁺ (p. ej., que expresan CAR) en o dentro de un cierto error de 1:1, la relación de iniciación del cultivo de las células CD4⁺ y CD8⁺ a menudo no es 1:1. En algunas realizaciones, la relación de iniciación de cultivo que da como resultado la relación de salida deseada varía, p. ej., de la fuente de las células, los tipos de células a cultivar, el paciente al que se administrarán las células, el sujeto o sujetos de a quién se han aislado o derivado las células, qué enfermedades o afecciones tiene un sujeto, la enfermedad a tratar, las condiciones de cultivo y otros parámetros.

[0173] En algunas realizaciones, la relación de iniciación del cultivo se basa en la composición de cada subpoblación de células. En ciertas realizaciones, la relación de iniciación del cultivo se basa en el período de tiempo durante el cual las poblaciones de células se cultivan antes de su ingeniería genética. En algunas realizaciones, la relación de iniciación del cultivo se basa en la tasa de proliferación de cada población de células.

[0174] Como otro aspecto, en algunas realizaciones, los métodos incluyen además determinar una relación o número de iniciación de cultivo. En algunas realizaciones, los métodos proporcionados incluyen métodos y pasos para determinar las proporciones apropiadas, las dosis, y los números de células, tipos de células, y las poblaciones de células. Por ejemplo, se proporcionan métodos para determinar las proporciones de células CD4⁺/CD8⁺, poblaciones y/o subpoblaciones y determinar las dosis apropiadas de tales células y subtipos. En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para determinar proporciones o números apropiados de tipos de células o poblaciones de células que se incluirán en una composición, tal como una composición iniciadora de cultivo, para lograr un resultado

deseado. En algunos aspectos, tales proporciones o números están diseñados para su uso en una incubación o etapa de ingeniería para lograr una proporción o dosis de salida deseada. En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para determinar la proporción deseada de las células, tipos o poblaciones, y/o números de células de los mismos, para la administración a un sujeto o paciente.

[0175] En algunas realizaciones, la relación de iniciación de cultivo elegida se basa en la capacidad relativa de los diferentes tipos de células o poblaciones para la supervivencia y/o la tasa de proliferación o expansión de cada población de células o tipo de célula (tal como CD4⁺ frente a células CD8⁺) en cultivo cuando se incuban en tales condiciones. Por lo tanto, en algunos aspectos, la tasa de proliferación, la supervivencia y/o las relaciones de salida se miden o evalúan después de incubaciones de prueba, p. ej., en un punto o puntos particulares en el tiempo después de la incubación, y/o después de un paso de crioconservación o congelación y/o después un deshielo después de dicho procedimiento, tal como justo antes de la administración, p. ej., al lado de la cama, para determinar las proporciones óptimas para el inicio del cultivo. Cualquiera de una serie de métodos bien conocidos para la determinación de las tasas de proliferación o supervivencia celular *in vitro* o *ex vivo* incluyen métodos de citometría de flujo como el marcado con éster succinimidílico de diacetato de carboxifluorosceína (CFSE) o un tinte fluorescente similar antes de la incubación, seguido de la evaluación de intensidad fluorescente por citometría de flujo, y/o la evaluación de la unión de las células a Anexina V u otros marcadores reconocedores de compuestos sobre o en células apoptóticas y/o captación de agentes interquelantes de ADN tales como yoduro de propidio o 7AAD, y de evaluación de la captación y/o de etapas del ciclo celular como medida de proliferación o apoptosis por citometría de flujo.

[0176] En algunas realizaciones, la relación de iniciación del cultivo se determina incubando dos poblaciones aisladas, p. ej., subpoblaciones, de células en un rango de diferentes proporciones en las composiciones de prueba, bajo ciertas condiciones de prueba, y evaluando uno o más resultados, tales como la relación de salida alcanzada después de un cierto período. En algunos aspectos, las condiciones son condiciones estimulantes, tales como aquellas condiciones aproximadas bajo las cuales las composiciones iniciadoras de cultivo deben incubarse para cultivo y/o etapas de ingeniería. Por ejemplo, las composiciones de prueba en algunos aspectos se administran en presencia de uno o más, p. ej., cada uno, de los mismos agentes estimulantes, medios, tampones, contenido de gas y/o en el mismo tipo de recipiente o contenedor, y/o durante la misma o aproximadamente la misma cantidad de tiempo que los parámetros que se usarán en los pasos de incubación y/o ingeniería que se usarán para preparar o producir la composición final, tal como la composición diseñada para la administración.

[0177] Las proporciones de prueba ejemplares para las composiciones iniciadoras de cultivo de prueba pueden incluir 90%/10%, 80%/20%, 70%/30%, 60/40%, 50/50%, 40/60% o aproximadamente, 30/70%, 20%/80% y 10%/90%, o 0,1:1, 0,5:1, 0,7:1, 0,8:1, 0,9:1, 1:1, 1:1,1, 1:1,2, 1:1,3, 1:1,4, 1:1,5, o más de 1:1,5, o aproximadamente 1:0,1, 1:0,4, 1:0,7, 1:0,8, 1:0,8, 1,1:1, 1,2:1, 1,3:1, 1,4:1 o 1,5:1 o más.

[0178] En algunos contextos, la relación apropiada de iniciación de cultivo de células CD4⁺ frente a células CD8⁺ para lograr una relación deseada de CD4:CD8 al final de la producción se determina en base a la subpoblación de CD4⁺ y/o CD8⁺ Las fracciones en un producto celular aislado particular, como la presencia y/o porcentaje de ingenuo, efector, y varios compartimentos de memoria están representados en una composición aislada particular. Dicha evaluación puede realizarse determinando la presencia o el nivel de varios marcadores de superficie en las células, como por citometría de flujo.

[0179] En algunas realizaciones, la relación de iniciación del cultivo se basa en el fenotipo de cada población de células. En ciertas realizaciones, la relación de iniciación del cultivo se basa en las condiciones del cultivo (p. ej., como la composición de los medios, la presencia y/o ausencia de factores de crecimiento, estimulantes y/u otros agentes, temperatura, condiciones de aireación, etc.).

[0180] En algunas realizaciones de los métodos descritos en este documento, la relación de iniciación de cultivo produce una composición de salida que comprende una relación de células CD4⁺: CD8⁺ o un número de tales subtipos o número de células total que está dentro de aproximadamente 10%, aproximadamente el 15%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 25%, aproximadamente el 30% aproximadamente el 35%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 45% o aproximadamente el 50% de la relación o dosis deseada, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores. En algunas realizaciones de los métodos descritos en este documento, la relación de iniciación del cultivo produce una composición de salida que tiene la relación deseada de células CD4⁺: CD8⁺ o dosis de tales células al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o más del 95% del tiempo, incluido cualquier rango entre estos valores. En ciertas realizaciones de los métodos, la relación de iniciación del cultivo produce una relación de células CD4⁺ a CD8⁺ en la composición de salida que está dentro del 20% de la relación de salida deseada al menos el 80% del tiempo. En algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, la composición de salida comprende una proporción de células CD4⁺ a CD8⁺ que está dentro de una diferencia tolerada de la relación de salida deseada, habiéndose determinado dicha diferencia tolerada como se ha descrito anteriormente, p. ej., mediante la administración de células CD4⁺ y CD8⁺ a uno o más sujetos en una pluralidad de relaciones.

b. Relaciones y dosis de salida

- 5 **[0181]** En algunas realizaciones, el método da como resultado una composición de salida que sigue uno o más pasos de procesamiento de la composición de iniciación de cultivo, tal como incubación, estimulación, activación, ingeniería y/o formulación de células. En algunas realizaciones, el método se realiza para lograr o dar como resultado una relación deseada de células CD4⁺ a CD8⁺, o subpoblaciones de las mismas, que está entre aproximadamente 2:1 y aproximadamente 1:5, aproximadamente 2:1 y aproximadamente 1:2, aproximadamente 1,5:1 y aproximadamente 1:5, aproximadamente 1,5:1 y aproximadamente 1:2, o aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:2) En algunas realizaciones, la relación de salida deseada de las células CD4⁺ a CD8⁺ en la composición de salida es 1:1 o es aproximadamente 1:1.
- 10 **[0182]** En algunas realizaciones, el método produce o genera una composición de salida, tal como una composición que contiene células T CD4⁺ genéticamente modificadas y células T CD8⁺ o subpoblaciones de las mismas, en donde la relación de salida de células CD4⁺ a CD8⁺ en la composición, o subpoblaciones de los mismos, está entre aproximadamente 2:1 y aproximadamente 1:5, aproximadamente 2:1 y aproximadamente 1:2, aproximadamente 1,5:1 y aproximadamente 1:5, en o aproximadamente 1,5:1 y en o aproximadamente 1:2, o en o aproximadamente 1:1 y en o aproximadamente 1:2. En algunas realizaciones, el método produce o genera una composición de salida que contiene una relación de salida de células CD4⁺ a CD8⁺ que es 1:1 o es aproximadamente 1:1.
- 15 **[0183]** En algunas realizaciones, la relación de salida de células T CD4⁺ a CD8⁺ es una relación que se desea como parte de una dosis de células T para inmunoterapia, tal como en relación con métodos de inmunoterapia adoptiva.
- 20 **[0184]** En algunas realizaciones, se determinan las dosis deseadas, tales como los números de células deseadas y/o las relaciones de salida deseadas de los tipos o poblaciones de células (p. ej., relaciones óptimas para la administración terapéutica a un paciente). En algunas realizaciones, los métodos incluyen etapas para determinar el error tolerado o la diferencia tolerada de una relación o dosis de salida o administración deseada, es decir, el margen de error por el cual la relación en una composición dada, p. ej., composición modificada, puede variar de una deseada relación de salida, y aún lograr un resultado deseado, como un grado aceptable de seguridad en un sujeto o paciente, o la eficacia en el tratamiento de una enfermedad o afección particular u otro efecto terapéutico.
- 25 **[0185]** En algunas realizaciones, la dosis, la relación deseada y/o el error tolerado depende de la enfermedad o condición a ser tratada, tema, fuente de células, tal como si las células son de un sujeto que tiene una afección o particular, la enfermedad y la si las células son para trasplante autólogo o alogénico, p. ej., si están aisladas de un sujeto que también recibirá las células en terapia celular adoptiva y/o si el sujeto ha recibido o está recibiendo otro tratamiento y/o la identidad de tal tratamiento. En algunas realizaciones, la relación, el número y/o la diferencia o error tolerado depende de una o más propiedades de las células, como la tasa de proliferación, la capacidad de supervivencia, la expresión de marcadores particulares o la secreción de factores, como las citocinas, o subpoblaciones aisladas antes de la incubación y los pasos de ingeniería. En algunos ejemplos, la proporción deseada y/o el error o la diferencia tolerados pueden variar según la edad, el sexo, la salud y/o el peso del sujeto, en los biomarcadores como una indicación del rasgo de la enfermedad, en los tratamientos que se administrarán conjuntamente o haber sido administrado previamente al sujeto.
- 30 **[0186]** En algunas realizaciones, la proporción deseada, la dosis y/o el error tolerado se determina administrando diversas composiciones de prueba, cada una de las cuales contiene los tipos de células o poblaciones de interés en diferentes proporciones o diferentes números a un sujeto de prueba, seguido de la evaluación de uno o más resultados o parámetros, tales como un parámetro indicativo de seguridad, eficacia terapéutica, concentración *in vivo* o localización de las células, y/u otro resultado deseado.
- 35 **[0187]** El sujeto de prueba en algunas realizaciones es un animal no humano, tal como un animal normal o un modelo animal de enfermedad, tal como la enfermedad o afección a tratar mediante la administración de las células. En algunas realizaciones, las diversas proporciones de prueba para la administración a sujetos de prueba son aproximadamente 90%/10%, 80%/20%, 70%/30%, 60/40%, 50/50%, 40/60%, 30/70%, 20%/80% y 10%/90%, p. ej., expresado como porcentaje de un tipo o subtipo de célula (p. ej., célula T CD4⁺ o subtipo de la misma) y otro tipo de célula (p. ej., células T CD8⁺ o células NK valores o sub-tipo de los mismos), y provisionales. Las relaciones se pueden expresar como porcentajes relativos o en cualquier otro formato, como relaciones de 0,1:1, 0,5:1, 0,7:1, 0,8:1, 0,9:1, 1:1, 1:1,1, 1:1,2, 1:1,3, 1:1,4, 1:1,5, o más de 1:1,5 o aproximadamente 1:0,1, 1:0,4, 1:0,7, 1:0,8, 1:0,8, 1,1:1, 1,2:1, 1,3:1, 1,4:1 o 1,5; 1 o más, incluido cualquier rango entre estos valores. En algunas realizaciones, el sujeto de prueba es un humano. En algunas realizaciones, la proporción deseada es la proporción promedio, media o mediana entre los sujetos de prueba con un efecto óptimo particular. En algunos aspectos, la relación deseada es una relación que logró un equilibrio óptimo de seguridad versus eficacia. En algunos aspectos, la proporción o dosis deseada es una proporción o dosis que logre la mayor eficacia de todas las proporciones o dosis de prueba, mientras se mantiene un umbral de seguridad. En algunos aspectos, la proporción o dosis deseada es una proporción o dosis que logra el mayor grado de seguridad mientras mantiene un umbral de eficacia o dentro de un rango de eficacia. En algunos casos, la proporción o dosis óptima se expresa como un rango, como entre 1:1 y 1:2 de un tipo de célula a otro o entre 10⁴ y 10⁹ o entre 10⁵ y 10⁶ células por kg de peso corporal.
- 40 **[0188]** En algunas realizaciones, el error tolerado se determina en base a la desviación de los sujetos de prueba promedio deseados que se controlan para evaluar la eficacia terapéutica y/o seguridad de cada combinación
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

porcentual. En algunas realizaciones, el error tolerado estará dentro de aproximadamente 1%, aproximadamente 2%, aproximadamente 3%, aproximadamente 4% aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50% de la relación deseada, incluido cualquier valor entre estos rangos.

6. Métodos ejemplares de selección o enriquecimiento de células

a. Secuencia de proceso único y/o selección simultánea usando perlas inmunomagnéticas

[0189] En algunas realizaciones, la separación y/o los pasos se llevan a cabo usando perlas inmunomagnéticas. En algunas realizaciones, una muestra celular que contiene células CD4⁺ y CD8⁺, tales como una muestra de células T humanas primarias, se pone en contacto con perlas magnéticas que contienen un primer reactivo de inmunofinidad que se une a CD4 o CD8 y perlas magnéticas que contienen un segundo reactivo de inmunofinidad que se une al otro del CD4 o CD8. La separación y/o los pasos pueden ocurrir simultáneamente y/o secuencialmente.

[0190] En algunas realizaciones, el contacto de las células con las perlas magnéticas se realiza simultáneamente, por lo que el enriquecimiento de las células que contienen los marcadores de superficie CD4 y CD8 también se realiza simultáneamente. En algunos de estos aspectos, el método incluye poner en contacto las células de una muestra que contiene células T humanas primarias con un primer reactivo de inmunofinidad que se une específicamente a CD4 y un segundo reactivo de inmunofinidad que se une específicamente a CD8 en una composición de incubación, en condiciones en las que los reactivos de inmunofinidad específicamente se unen a las moléculas CD4 y CD8, respectivamente, en la superficie de las células en la muestra, y recuperan las células unidas al primer y/o segundo reactivo de inmunofinidad, generando así una composición enriquecida que incluye células CD4⁺ y células CD8⁺ en una relación de iniciación de cultivo.

[0191] En algunas realizaciones, el primer y/o segundo reactivo de inmunofinidad están presentes en la composición de incubación a una concentración de rendimiento subóptima, por lo que la composición enriquecida contiene menos del 70% del total de células CD4⁺ en la composición de incubación y/o menos del 70% de las células CD8⁺ en la composición de incubación, produciendo así una composición enriquecida para las células T CD4⁺ y CD8⁺.

[0192] En algunas realizaciones, la concentración de rendimiento subóptima del reactivo de afinidad es una concentración por debajo de una concentración utilizada o requerida para lograr un rendimiento óptimo o máximo de células unidas en una selección o enriquecimiento dado que incuba las células con el reactivo y se recupera o separa células que se han unido al reactivo ("rendimiento", p. ej., es el número de células así recuperadas o seleccionadas en comparación con el número total de células en la incubación a las que se dirige el reactivo o al que el reactivo es específico o que tener un marcador para el cual el reactivo es específico y capaz de unirse). La concentración de rendimiento subóptima generalmente es una concentración o cantidad del reactivo que en dicho proceso o etapa no logra más del 70% de rendimiento de las células unidas, tras la recuperación de las células que se han unido al reactivo. En algunas realizaciones, la concentración subóptima no alcanza más del 50%, 45%, 40%, 30% o 25% de rendimiento o aproximadamente. La concentración puede expresarse en términos de número o masa de partículas o superficies por célula y/o número de masa o moléculas de agente (p. ej., anticuerpo, tal como fragmento de anticuerpo) por célula.

[0193] Por ejemplo, en algunas realizaciones, la concentración de rendimiento subóptima es menor que aproximadamente 30 μm de agente (p. ej., anticuerpo) por 1 X 10⁹, por 2 X 10⁹ células, por 3 X 10⁹ células, por 4 X 10⁹ células, por 5 X 10⁹ células, por 10 X 10⁹ células, por 15 X 10⁹ células, o por 20 X 10⁹ células en la composición de incubación. En algunas realizaciones, la concentración de rendimiento subóptima es menor que o aproximadamente 30 μM agente (p. ej., anticuerpo) por 1 X 10⁹, por 2 X 10⁹ células, por cada 3 X 10⁹ células, por 4 X 10⁹ células, por 5 X 10⁹ células, por 10 X 10⁹ células, por 15 X 10⁹ células, o por 20 X 10⁹ células en la composición de incubación; en algunas realizaciones, la concentración de rendimiento subóptima es menor que aproximadamente 20 μm de agente (p. ej., anticuerpo) por 1 X 10⁹, por 2 X 10⁹ células, por 3 X 10⁹ células, por 4 X 10⁹ células, por 5 X 10⁹ células, por 10 X 10⁹ células, por 15 X 10⁹ células, o por 20 X 10⁹ células en la composición de incubación; en algunas realizaciones, la concentración de rendimiento subóptima es menor que aproximadamente 10 μm de agente (p. ej., anticuerpo) por 1 X 10⁹, por 2 X 10⁹ células, por 3 X 10⁹ células, por 4 X 10⁹ células, por 5 X 10⁹ células, por 10 X 10⁹ células, por 15 X 10⁹ células, o por 20 X 10⁹ células en la composición de incubación; en algunas realizaciones, la concentración de rendimiento subóptima es menor que aproximadamente 15 μm de agente (p. ej., anticuerpo) por 1 X 10⁹, por 2 X 10⁹ células, por 3 X 10⁹ células, por 4 X 10⁹ células, por 5 X 10⁹ células, por 10 X 10⁹ células, por 15 X 10⁹ células, o por 20 X 10⁹ células en la composición de incubación; en algunas realizaciones, la concentración de rendimiento subóptima es menor que aproximadamente 10 μm de agente (p. ej., anticuerpo) por 1 X 10⁹, por 2 X 10⁹ células, por 3 X 10⁹ células, por 4 X 10⁹ células, por 5 X 10⁹ células, por 10 X 10⁹ células, por 15 X 10⁹ células, o por 20 X 10⁹ células en la composición de incubación; en algunas realizaciones, la concentración de rendimiento subóptima es menor que aproximadamente 5 μm de agente (p. ej., anticuerpo) por 1 X 10⁹, por 2 X 10⁹ células, por 3 X 10⁹ células, por 4 X 10⁹ células, por 5 X 10⁹ células, por 10 X 10⁹ células, por 15 X 10⁹ células, o por 20 X 10⁹ células en la composición de incubación; en algunas realizaciones, la concentración de rendimiento subóptima es menor que aproximadamente 1 μm de agente (p. ej., anticuerpo) por 1 X 10⁹, por 2 X 10⁹ células, por 3 X 10⁹ células, por 4 X 10⁹

células, por 5×10^9 células, por 10×10^9 células, por 15×10^9 células, o por 20×10^9 células en la composición de incubación; en algunas realizaciones, la concentración de rendimiento subóptima es menor que aproximadamente $0,5 \mu\text{m}$ de agente (p. ej., anticuerpo) por 1×10^9 , por 2×10^9 células, por 3×10^9 células, por 4×10^9 células, por cada 5×10^9 células, por 10×10^9 células, por 15×10^9 células, o por 20×10^9 células en la composición de incubación; en algunas realizaciones, la concentración de rendimiento subóptima es menor que aproximadamente $0,2 \mu\text{m}$ de agente (p. ej., anticuerpo) por 1×10^9 , por 2×10^9 células, por 3×10^9 células, por 4×10^9 células, por 5×10^9 células, por 10×10^9 células, por 15×10^9 células, o por 20×10^9 células en la composición de incubación.

[0194] En algunas realizaciones, la concentración de rendimiento subóptima es menor que aproximadamente 15 mg de perlas, partículas, superficie o regente total, por 1×10^9 , por 2×10^9 células, por 3×10^9 células, por 4×10^9 células, por 5×10^9 células, por 10×10^9 células, por 15×10^9 células, o por 20×10^9 células en la composición de incubación; en algunas realizaciones, la concentración de rendimiento subóptima es menor que aproximadamente 10 mg de perlas, partículas, superficie o regente total, por 1×10^9 , por 2×10^9 células, por 3×10^9 células, por 4×10^9 células, por 5×10^9 células, por 10×10^9 células, por 15×10^9 células, o por 20×10^9 células en la composición de incubación; en algunas realizaciones, la concentración de rendimiento subóptima es menor que aproximadamente 5 mg de perlas, partículas, superficie o regente total, por 1×10^9 , por 2×10^9 células, por 3×10^9 células, por 4×10^9 células, por 5×10^9 células, por 10×10^9 células, por 15×10^9 células, o por 20×10^9 células en la composición de incubación; en algunas realizaciones, la concentración de rendimiento subóptima es menor que aproximadamente 4 mg de perlas, partículas, superficie o regente total, por 1×10^9 , por 2×10^9 células, por 3×10^9 células, por 4×10^9 células, por 5×10^9 células, por 10×10^9 células, por 15×10^9 células, o por 20×10^9 células en la composición de incubación; en algunas realizaciones, la concentración de rendimiento subóptimo es menor que o aproximadamente 3 mg de perlas, partículas, superficie, o reactivo total de, por 1×10^9 , por 2×10^9 células, por cada 3×10^9 células, por 4×10^9 células, por 5×10^9 células, por 10×10^9 células, por 15×10^9 células, o por 20×10^9 células en la composición de incubación; en algunas realizaciones, la concentración de rendimiento subóptima es menor que aproximadamente 2 mg de perlas, partículas, superficie o regente total, por 1×10^9 , por 2×10^9 células, por 3×10^9 células, por 4×10^9 células, por 5×10^9 células, por 10×10^9 células, por 15×10^9 células, o por 20×10^9 células en la composición de incubación; en algunas realizaciones, la concentración de rendimiento subóptima es menor que aproximadamente 1 mg de perlas, partículas, superficie o regente total, por 1×10^9 , por 2×10^9 células, por 3×10^9 células, por 4×10^9 células, por 5×10^9 células, por 10×10^9 células, por 15×10^9 células, o por 20×10^9 células en la composición de incubación; en algunas realizaciones, la concentración de rendimiento subóptima es menor que aproximadamente $0,5 \text{ mg}$ de perlas, partículas, superficie o reactivo total, por 1×10^9 , por 2×10^9 células, por 3×10^9 células, por 4×10^9 células, por 5×10^9 células, por 10×10^9 células, por 15×10^9 células, o por 20×10^9 células en la composición de incubación.

[0195] En algunas realizaciones, p. ej., cuando se opera en una concentración de rendimiento subóptima para cada uno o más de dos o más reactivos de selección con afinidad a dos o más marcadores o células, se usa uno o más de tales reactivos a una concentración que es mayor que uno o más de los otros reactivos de este tipo, a fin de sesgar la proporción del tipo de célula reconocido por ese reactivo en comparación con el tipo de célula reconocido por el (los) otro(s). Por ejemplo, el reactivo que se une específicamente al marcador para el cual se desea sesgar la relación puede incluirse en una concentración (p. ej., agente o masa por células) que se incrementa a la mitad, 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces o más, en comparación con otro(s), dependiendo de cuánto se desee aumentar la relación.

[0196] En algunas realizaciones, emplear una concentración de rendimiento subóptima para sesgar una o ambas poblaciones de células puede lograr una relación de iniciación de cultivo deseada o elegida. En algunas realizaciones, la selección se realiza a partir de una muestra, que es una muestra que contiene células CD4^+ y CD8^+ , que contiene un alto número de células, como al menos 1×10^9 células, 2×10^9 células, 3×10^9 células, 4×10^9 células, 5×10^9 células, 6×10^9 células, 7×10^9 células, 8×10^9 células, 1×10^{10} células, 2×10^{10} células, 3×10^{10} células, 4×10^{10} células, 5×10^{10} células o más. En algunas realizaciones, el alto número de células es suficiente para asegurar la saturación de los reactivos de inmunofinidad en la muestra a las células que expresan un marcador, tal como CD4 o CD8, en donde el reactivo se une específicamente.

[0197] En algunas realizaciones, cuando se opera en el rango subóptimo y/o con suficientes células para lograr la saturación de reactivos, la cantidad de reactivo de inmunofinidad es proporcional al rendimiento aproximado de células enriquecidas. En una realización, para lograr una relación de iniciación de cultivo de aproximadamente o aproximadamente 1:1 de células CD4^+ a células CD8^+ , la selección de células CD4^+ y células CD8^+ se puede realizar con la misma concentración de rendimiento de inmunofinidad, o aproximadamente la misma, con un rendimiento subóptimo de reactivos de inmunofinidad a CD4 y CD8, respectivamente. En otra realización ejemplar, para lograr una relación de iniciación de cultivo de aproximadamente o aproximadamente 2:1 de células CD4^+ a células CD8^+ , la selección de células CD4^+ se puede realizar con una concentración de rendimiento subóptima de un reactivo de inmunofinidad a CD4 que es aproximadamente o aproximadamente dos veces mayor que la concentración de rendimiento subóptima de un reactivo de inmunofinidad para CD8. Está dentro del nivel de un experto en la técnica seleccionar empíricamente o elegir una cantidad o concentración apropiada de reactivos de inmunofinidad dependiendo de la relación iniciadora de cultivo deseada o elegida de la composición generada que contiene células enriquecidas o seleccionadas en vista de la ejemplificación anterior.

[0198] En algunas realizaciones, la separación y/o los pasos se llevan a cabo utilizando perlas magnéticas en las que

los reactivos de inmunofinidad se unen de forma reversible, tal como a través de una interacción ligando peptídico con una mteína de estreptavidina como se describió anteriormente. Ejemplos de tales perlas magnéticas son Streptamers®. En algunas realizaciones, la separación y/o los pasos se llevan a cabo utilizando perlas magnéticas, tales como las disponibles comercialmente de Miltenyi Biotec.

[0199] En algunos aspectos, la separación y/u otros pasos se llevan a cabo para la separación automática de células a nivel de escala clínica en un sistema cerrado y estéril. Los componentes pueden incluir un microordenador integrado, unidad de separación magnética, bomba peristáltica y varias válvulas de presión. La computadora integrada en algunos aspectos controla todos los componentes del instrumento y dirige al sistema a realizar procedimientos repetidos en una secuencia estandarizada. La unidad de separación magnética en algunos aspectos incluye un imán permanente móvil y un soporte para la columna de selección. La bomba peristáltica controla el caudal en todo el conjunto de tubos y, junto con las válvulas de presión, asegura el flujo controlado de tampón a través del sistema y la suspensión continua de células. En algunos aspectos, la separación y/o otros pasos se lleva a cabo utilizando el sistema de CliniMACS (Miltenyi Biotec).

[0200] En algunas realizaciones, la separación automatizada, tal como el uso del sistema CliniMACS, en algunos aspectos usa partículas magnetizables acopladas a anticuerpos que se suministran en una solución estéril no pirogénica. En algunas realizaciones, después de marcar las células con partículas magnéticas, las células se lavan para eliminar el exceso de partículas. Luego se conecta una bolsa de preparación de células al conjunto de tubos, que a su vez se conecta a una bolsa que contiene tampón y una bolsa de recolección de células. El conjunto de tubos consta de tubos estériles premontados, que incluyen una columna previa y una columna de separación, y son para un solo uso. Después del inicio del programa de separación, el sistema aplica automáticamente la muestra de células a 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 pasos de lavado. En algunas realizaciones, las poblaciones de células para uso con los métodos descritos en este documento no están marcadas y no se retienen en la columna. En algunas realizaciones, las poblaciones de células para uso con los métodos descritos en el presente documento están marcadas y se retienen en la columna. En algunas realizaciones, las poblaciones de células para usar con los métodos descritos en la presente memoria se eluyen de la columna después de la eliminación del campo magnético, y se recogen dentro de la bolsa de recogida de células.

[0201] En ciertas realizaciones, la separación y/u otros pasos se llevan a cabo usando un sistema equipado con una unidad de procesamiento de células que permite el lavado automático y el fraccionamiento de células por centrifugación. En algunos aspectos, la separación y/u otros pasos se llevan a cabo utilizando el sistema CliniMACS Prodigy (Miltenyi Biotec). Un sistema con una célula de unidad de procesamiento también puede incluir una cámara y software de reconocimiento de imágenes a bordo que determina el punto final del fraccionamiento de células óptimo por discernir las capas macroscópicas del producto de célula de origen. Por ejemplo, la sangre periférica se separa automáticamente en eritrocitos, glóbulos blancos y capas plasmáticas. Un sistema de procesamiento celular, como el sistema CliniMACS Prodigy, también puede incluir una cámara de cultivo celular integrada que cumple protocolos de cultivo celular como, p. ej., diferenciación y expansión celular, carga de antígeno y cultivo celular a largo plazo. Los puertos de entrada pueden permitir la eliminación estéril y el reabastecimiento de medios y células se pueden monitorear utilizando un microscopio integrado. Ver, p. ej., Klebanoff et al. (2012) J Immunother. 35 (9): 651-660, Terakura et al. (2012) Sangre. 1: 72-82, y Wang et al. (2012) J Immunother. 35 (9): 689-701.

[0202] En algunas realizaciones, una población celular descrita en el presente documento se recoge y enriquece (o agota) mediante citometría de flujo, en donde las células teñidas para múltiples marcadores de superficie celular se transportan en una corriente fluidica. En algunas realizaciones, una población celular descrita en el presente documento se recoge y enriquece (o agota) a través de una clasificación preparativa (FACS). En ciertas realizaciones, una población celular descrita en este documento se recoge y enriquece (o agota) mediante el uso de chips de sistemas microelectromecánicos (MEMS) en combinación con un sistema de detección basado en FACS (véase, p. ej., WO 2010/033140, Cho et al. (2010) Lab Chip 10, 1567-1573; y Godin et al. (2008) J Biophoton. 1 (5): 355-376. En ambos casos, las células pueden marcarse con múltiples marcadores, lo que permite el aislamiento de subconjuntos de células T bien definidos con alta pureza.

[0203] En algunas realizaciones, los anticuerpos o parejas de unión se marcan con uno o más marcadores detectables, para facilitar la separación para la selección positiva y/o negativa. Por ejemplo, la separación puede basarse en la unión a fluoroscencia anticuerpos marcados. En algunos ejemplos, la separación de células basada en la unión de anticuerpos u otros pares de unión específicos para uno o más marcadores de la superficie celular se llevan a cabo en una corriente fluidica, tal como mediante clasificación celular activada por fluoroscencia (FACS), incluida la escala preparativa (FACS) y/o microelectrom chips de sistemas mecánicos (MEMS), p. ej., en combinación con un sistema de detección de citometría de flujo. Dichos métodos permiten la selección positiva y negativa basada en múltiples marcadores simultáneamente.

b. Flujo de proceso único y/o selecciones secuenciales usando cromatografía de inmunofinidad

[0204] En algunas realizaciones, la primera selección o enriquecimiento de una población de células y la segunda selección y/o enriquecimiento de una población de células se realizan usando reactivos basados en inmunofinidad

que incluyen al menos una primera y segunda matriz de cromatografía de afinidad, respectivamente, que han inmovilizado sobre ellas un anticuerpo. En algunas realizaciones, una o ambas de la primera y/o segunda selección pueden emplear una pluralidad de matrices y/o anticuerpos de cromatografía de afinidad, por lo que la pluralidad de matrices y/o anticuerpos empleados para la misma selección, es decir, la primera selección o la segunda selección, están conectados en serie. En algunas realizaciones, la matriz o matrices de cromatografía de afinidad empleadas en una primera y/o segunda selección adsorbe o es capaz de seleccionar o enriquecer al menos aproximadamente 50×10^6 células/ml, 100×10^6 células/ml, 200×10^6 células/ml o 400×10^6 células/ml. En algunas realizaciones, la capacidad de adsorción se puede modular en función del diámetro y/o longitud de la columna. En algunas realizaciones, la relación iniciadora de cultivo de la composición seleccionada o enriquecida se logra eligiendo una cantidad suficiente de matriz y/o en una cantidad relativa suficiente para lograr la relación iniciadora de cultivo suponiendo, p. ej., la capacidad de adsorción de la columna o columnas para seleccionar células.

[0205] En una realización ejemplar, la capacidad de adsorción de la matriz o matrices es la misma entre la primera y la segunda selección, p. ej., es o es aproximadamente 1×10^8 células/ml para ambas, por lo que el enriquecimiento o la selección de células en la primera selección y la segunda selección da como resultado una composición que contiene células CD4⁺ a células CD8⁺ en una relación iniciadora de cultivo de aproximadamente 1:1. En otra realización ejemplar, la capacidad de adsorción de la matriz o matrices usadas en una de la primera selección o la segunda selección es al menos 1,5 veces, 2,0 veces, 3,0 veces, 4,0 veces, 5,0 veces, 6,0 veces, 7,0 veces, 8,0 veces, 9,0 veces, 10,0 veces o más que la capacidad de adsorción de la matriz o matrices utilizadas en la otra de la primera selección o segunda selección, lo que da como resultado una relación de iniciación del cultivo en donde las células seleccionadas con la mayor capacidad de adsorción, p. ej., células CD4⁺ o células CD8⁺, están presentes en la relación de iniciación del cultivo en una cantidad que es al menos 1,5 veces, 2,0- veces, 3,0 veces, 4,0 veces, 5,0 veces, 6,0 veces, 7,0 veces, 8,0 veces, 9,0 veces, 10,0 veces o más que la otra población celular. Es dentro del nivel de un experto en la materia para seleccionar o escoger un volumen apropiada, el diámetro o el número de matriz de afinidad columnas de cromatografía para la primera y/o segunda selección dependiendo de la relación cultivo-iniciar deseada o elegida de la composición generada con adición enriquecida o células seleccionadas.

[0206] Los procesos ejemplares para llevar a cabo selecciones por los métodos proporcionados se exponen en el Ejemplo 2. En algunas realizaciones, tales procesos logran una relación deseada de iniciación de cultivo en una composición enriquecida o generada.

[0207] En algunas realizaciones, la primera y/o segunda selección en los métodos proporcionados incluye primero enriquecer para una de las células CD4⁺ o CD8⁺, y luego enriquecer para una subpoblación de células basada, p. ej., en la expresión de la superficie de un marcador expresado en células T en reposo, ingenuas o de memoria central, p. ej., un marcador que es CD28, CD62L, CCR7, CD127 o CD27. En algunas realizaciones, la primera y/o segunda selección incluye enriquecimiento para células CD8⁺, dicha selección comprende además enriquecimiento para células T (T_{CM}) de memoria central, donde la otra de la primera y/o segunda selección incluye enriquecimiento para células CD4⁺. En alguna realización, se llevan a cabo los métodos para enriquecer o seleccionar las células CD4⁺ y para enriquecer o seleccionar para una sub-población de células que son CD8⁺/CD28⁺, CD8⁺/CD62L⁺, CD8⁺/CCR7⁺, CD8⁺/CD127⁺ o CD8⁺/CD27⁺. En algunas realizaciones, la primera selección incluye enriquecimiento para células CD8⁺ y la segunda selección incluye enriquecimiento para células CD4⁺, donde la primera selección, que incluye células enriquecidas para células CD8⁺, incluye además enriquecimiento para células T (T_{CM}) de memoria central o enriquecimiento para células que expresan un marcador que es CD28, CD62L, CCR7, CD127 o CD27, generando así una composición, como una composición de iniciación de cultivo, que contiene células CD4⁺ y CD8⁺ enriquecidas para células T (T_{CM}) de memoria central o una célula que expresa un marcador que es CD28, CD62L, CCR7, CD127 o CD27. En algunas realizaciones, la primera selección incluye enriquecimiento para células CD4⁺ y la segunda selección incluye enriquecimiento para células CD8⁺, en donde la segunda selección, que incluye células enriquecidas para células CD8⁺, incluye además enriquecimiento para células T (T_{CM}) de memoria central o enriquecimiento para células que expresan un marcador que es CD28, CD62L, CCR7, CD127 o CD27, generando de este modo una composición, tal como una composición de iniciación de cultivo, que contiene células CD4⁺ y CD8⁺ enriquecidas para las células T de memoria central (T_{CM}) o una célula que expresa un marcador que es CD28, CD62L, CCR7, CD127 o CD27.

[0208] En algunas de tales realizaciones que implican un enriquecimiento adicional de una subpoblación de células, para lograr la relación de iniciación de cultivo de células CD4⁺ o una subpoblación de las mismas a células CD8⁺ o una subpoblación de las mismas, la capacidad de adsorción de una matriz de columna o las matrices se ajustan para tener en cuenta las diferencias en la frecuencia de una subpoblación, es decir, células CD4⁺ o CD8⁺ enriquecidas para células en reposo, ingenuas, células de memoria central o células que expresan un marcador que es CD28, CD62L, CCR7, CD127 o CD27, en comparación con la frecuencia de las células de la respectiva población progenitora CD4⁺ o CD8⁺ en la muestra inicial del sujeto. El nivel relativo o la frecuencia de varias poblaciones celulares en un sujeto se puede determinar en base a la evaluación de la expresión superficial de un marcador o marcadores presentes en tales poblaciones o subpoblaciones. Se pueden usar varios métodos bien conocidos para evaluar el nivel de expresión de marcadores de superficie o proteínas, como la detección por métodos basados en afinidad, p. ej., métodos basados en inmunofluorescencia, p. ej., en el contexto de proteínas de superficie celular, como por flujo citometría.

[0209] En una realización ejemplar, una muestra se enriquece para células CD4⁺ y CD8⁺/CD62L⁺ para producir una

relación CD4⁺ a CD8⁺ de 1:1. En esta realización ejemplar, la primera selección puede incluir enriqueciendo para las células CD8⁺ usando una columna con una capacidad de adsorción ajustado para las frecuencias relativas de las células CD4⁺ a células CD8⁺/CD62L⁺ se sabe están presentes en la muestra, o utilizando relaciones en general se prevé que estén en tales muestras, por ejemplo, la subpoblación CD62L⁺ de células CD8⁺ recolectadas de un sujeto humano a veces puede representar aproximadamente el 25% de la fracción total de células T CD8⁺. Ver, p. ej., Maldonado, *Arthritis Res Ther.* 2003; 5 (2): R91-R96. En tal realización, las columnas pueden agruparse para recoger 4 veces más células CD8⁺ que células CD4⁺ para generar una relación de iniciación de cultivo 1:1 de las células CD4⁺ y la subpoblación CD8⁺ que contiene además células CD62L⁺. Por lo tanto, suponiendo una capacidad de adsorción y eficiencia similares para cada columna de selección, la columna CD8⁺ puede ser aproximadamente o aproximadamente 4 veces más grande que la columna de selección CD4 o la columna de selección CD62L. El tamaño de las columnas también se puede ajustar para el rendimiento esperado. Por ejemplo, si cada columna es sólo el 80% de eficiencia, el tamaño de cada columna se puede ajustar para tener en cuenta la eficiencia de cada selección posterior.

[0210] Por ejemplo, una composición de la iniciación del cultivo deseado o elegido puede ser uno que contiene 200 X 10⁶ células CD4⁺ y 200 X 10⁶ CD8⁺/+ células CD62L. En este ejemplo, suponiendo las proporciones presentadas anteriormente, la muestra a enriquecer puede contener al menos o alrededor de 200 X 10⁶ células CD4⁺ y al menos o alrededor de 800 X 10⁶ células CD8⁺, de las cuales aproximadamente el 25% (200 X 10⁶) también puede ser CD62L⁺. Suponiendo que cada 2 µL de matriz de selección puede enriquecer para aproximadamente 200 X 10⁶ células, una columna de selección CD8 con 8 µL de matriz de selección puede unir aproximadamente o aproximadamente 800 X 10⁶ células CD8⁺ mientras el flujo pasa a la columna de selección CD4. Una columna de selección CD4 con 2 ml de matriz de selección puede unirse alrededor de o aproximadamente 200 X 10⁶ células CD4⁺. Las células CD8⁺ pueden enriquecerse aún más para CD62L eluyendo las células CD8⁺ en una columna de selección CD62L. En este ejemplo de realización, la columna de la selección CD62L puede contener 2 µL de matriz de selección, enriqueciendo así por alrededor de o aproximadamente 200 X 10⁶ células CD8⁺/CD62L⁺. Las columnas CD4 y CD8/CD62L pueden eluirse en un recipiente de cultivo, produciendo la composición de cultivo de iniciación o una composición que tiene aproximadamente o aproximadamente un cultivo 1:1. relación de iniciación.

[0211] En otro ejemplo de realización, una muestra se enriquece en células CD4⁺ y CD8⁺/CCR7⁺ para producir un CD4⁺ a CD8⁺ proporción de 1:1. En esta realización ejemplar, la primera selección puede incluir el enriquecimiento de células CD8⁺ usando una columna con una capacidad de adsorción ajustada para las frecuencias relativas de células CD4⁺ a células CD8⁺/CCR7⁺ que se sabe que están presentes en la muestra, o usando relaciones generalmente estimadas en tales muestras. P. ej., la subpoblación CCR7⁺ de células CD8⁺ recolectadas de un sujeto humano a veces puede ser aproximadamente el 60% de la fracción total de células T CD8⁺. Ver, p. ej., Chen, *Blood.* 1 de julio de 2001; 98 (1):156-64. Las columnas se pueden agrupar para recolectar 3 1/3 veces más células CD8⁺ que las células CD4⁺ para generar una relación de iniciación de cultivo 1:1. Suponiendo una capacidad de adsorción y eficiencia similares para cada columna de selección, la columna CD8⁺ puede ser aproximadamente o aproximadamente 3 1/3 más grande que la columna de selección CD4 o la columna de selección CCR7. El tamaño de las columnas también se puede ajustar para el rendimiento esperado. Por ejemplo, si cada columna tiene solo un 80% de eficiencia, el tamaño de cada columna se puede ajustar para tener en cuenta la eficiencia de cada selección posterior.

[0212] P. ej., un cultivo de iniciación deseado puede contener 200 X 10⁶ células CD4⁺ y 200 X 10⁶ células CD8⁺/CCR7⁺. En este ejemplo, suponiendo que las proporciones presentadas anteriormente, la muestra a enriquecer puede contener al menos 200 X 10⁶ células CD4⁺ y al menos o alrededor de 6,6 X 10⁶ células CD8⁺, aproximadamente el 60% de las cuales (200 X 10⁶) también pueden ser CCR7⁺. Suponiendo que cada 2 µL de matriz de selección puede enriquecer para 200 X 10⁶ células, una columna de selección CD8 con 3 1/3 µL de matriz de selección puede unir aproximadamente o aproximadamente 6,6x10⁶ células CD8⁺ mientras el flujo pasa a la columna de selección CD4. Una columna de selección CD4 con 2 ml de matriz de selección puede unirse alrededor de o aproximadamente 200 X 10⁶ células CD4⁺. Las células CD8⁺ pueden enriquecerse aún más para CD62L eluyendo las células CD8⁺ en una columna de selección CCR7. En este ejemplo de realización, la columna de la selección CCR7 puede contener 1 µL de matriz de selección, enriqueciendo así por alrededor de o aproximadamente 200 X 10⁶ células CD8⁺/CCR7⁺. Las columnas CD4 y CCCR7 pueden eluirse en un recipiente de cultivo, produciendo el cultivo de iniciación que contiene aproximadamente o aproximadamente 200 X 10⁶ células CD4⁺ y aproximadamente o alrededor de 200 X 10⁶ células CD8⁺/CCR7⁺, o una relación 1:1 de iniciación de cultivo.

[0213] Está dentro del nivel de un experto en la técnica seleccionar empíricamente o elegir un volumen, diámetro o número apropiado de columnas de cromatografía de matriz de afinidad para la primera y/o segunda y/o tercera selección dependiendo de la relación de iniciación de cultivo deseada o elegida de la composición generada que contiene células enriquecidas o seleccionadas, la frecuencia esperada de cada sub-población, las diferentes eficiencias de cada columna de selección y otros factores dentro del nivel del experto artesano y en vista de la ejemplificación anterior.

B. Incubación de células aisladas

[0214] En algunas realizaciones, los métodos proporcionados incluyen uno o más de varios pasos para incubar células aisladas y poblaciones de células, tales como poblaciones aisladas de acuerdo con los métodos de este documento,

tales como pasos para incubar una población de células T CD4⁺ aisladas, p. ej., población de células T CD4⁺ no fraccionadas o subpoblación(es) de las mismas, y una población de células T CD8⁺ aisladas, p. ej., población de células T CD8⁺ no fraccionadas aisladas o subpoblación(s) de las mismas. En algunas realizaciones, las poblaciones celulares se incuban en una composición iniciadora de cultivo.

[0215] La pluralidad de poblaciones de células aisladas, p. ej., las poblaciones de células CD4⁺ y CD8⁺ (p. ej., no fraccionadas o subpoblaciones de las mismas) se incuban generalmente con las poblaciones de células combinadas en una composición iniciadora de cultivo en el mismo recipiente de cultivo, tal como la misma unidad, cámara, pozo, columna, tubo, conjunto de tubos, válvula, vial, placa de cultivo, bolsa u otro recipiente para cultivo o cultivo de células.

[0216] En algunos aspectos, las poblaciones de células o tipos de células están presentes en la composición en una proporción de inicio de cultivo, p. ej., la relación de células CD4⁺ y CD8⁺, diseñado para conseguir una proporción de salida deseada en particular, o una relación que está dentro de un cierto rango de error tolerado de dicha relación de salida deseada, siguiendo los pasos de incubación y/o de ingeniería, o diseñado para hacerlo un cierto porcentaje del tiempo. La relación de salida, p. ej., puede ser una relación óptima para lograr uno o más efectos terapéuticos tras la administración a un paciente, p. ej., mediante terapia celular adoptiva. En algunos aspectos, la relación de iniciación de cultivo se determina empíricamente, p. ej., usando un método de determinación como se describe aquí, p. ej., para determinar la relación óptima de iniciación de cultivo para lograr una relación de salida deseada en un contexto particular.

[0217] Los pasos de incubación pueden incluir cultivo, estimulación, activación, propagación, incluso mediante incubación en presencia de condiciones estimulantes, p. ej., condiciones diseñadas para inducir la proliferación, expansión, activación y/o supervivencia de células en la población, para imitar la exposición al antígeno, y/o preparar las células para la ingeniería genética, como la introducción de un receptor de antígeno genéticamente modificado.

[0218] Las condiciones pueden incluir uno o más medios particulares, temperatura, contenido de oxígeno, contenido de dióxido de carbono, tiempo, agentes, p. ej., nutrientes, aminoácidos, antibióticos, iones y/o factores estimulantes, tales como citocinas, quimiocinas, antígenos, pares de unión, proteínas de fusión, receptores solubles recombinantes y cualquier otro agente diseñado para activar las células. En un ejemplo, las condiciones estimulantes incluyen uno o más agentes, p. ej., ligando, que activa o inicia la cascada de señalización intracelular de TCR/CD3 en una célula T. Dichos agentes pueden incluir anticuerpos, tales como los específicos para un componente de TCR y/o un receptor coestimulador, p. ej., anti-CD3, anti-CD28, anti-4-1BB, p. ej., unidos a un soporte sólido tal como un cordón, y/o una o más citoquinas. Opcionalmente, el método de expansión puede comprender además la etapa de agregar anticuerpos anti-CD3 y/o anti CD28 al medio de cultivo (p. ej., a una concentración de al menos aproximadamente 0,5 ng/ml). Opcionalmente, el método de expansión puede comprender además la etapa de agregar IL-2 y/o IL-15 y/o IL-7 y/o IL-21 al medio de cultivo (p. ej., en donde la concentración de IL-2 es al menos aproximadamente 10 unidades/m 1).

[0219] En algunos aspectos, la incubación se lleva a cabo de acuerdo con técnicas tales como las descritas en la Patente de Estados Unidos Nº 6,040,1 77 de Riddell et al., Klebanoff et al. (2012) J Immunother. 35 (9): 651-660, Terakura et al. (2012) Blood. 1: 72-82, y/o Wang et al. (2012) J Immunother. 35 (9): 689-701.

[0220] En algunas realizaciones, las poblaciones de células, tales como las poblaciones o subpoblaciones CD4⁺ y CD8⁺, se expanden mediante la adición a las células alimentadoras de la composición iniciadora del cultivo, tales como las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) no divisorias (p. ej., de modo que la población de células resultante contenga al menos aproximadamente 5, 10, 20 o 40 o más células alimentadoras de PBMC para cada linfocito T en la población inicial a expandir); e incubar el cultivo (p. ej., durante un tiempo suficiente para expandir el número de células T). En algunos aspectos, las células alimentadoras no divisorias pueden comprender células alimentadoras PBMC irradiadas con rayos gamma. En algunas realizaciones, las PBMC se irradian con rayos gamma en el intervalo de aproximadamente 3000 a 3600 rads para evitar la división celular. En algunos aspectos, las células alimentadoras se agregan al medio de cultivo antes de la adición de las poblaciones de células T.

[0221] En algunas realizaciones, las condiciones estimulantes incluyen temperatura adecuada para el crecimiento de linfocitos T humanos, p. ej., al menos aproximadamente 25 grados Celsius, generalmente al menos aproximadamente 30 grados, y generalmente a aproximadamente 37 grados Celsius. En algunas realizaciones, un cambio de temperatura se efectúa durante el cultivo, tal como de 37 grados Celsius a 35 grados Celsius. Opcionalmente, la incubación puede comprender además la adición de células linfoblastoides transformadas por EBV no divisorias (LCL) como células alimentadoras. LCL puede irradiarse con rayos gamma en el rango de aproximadamente 6000 a 10.000 rads. Las células alimentadoras de LCL en algunos aspectos se proporcionan en cualquier cantidad adecuada, tal como una relación de células alimentadoras de LCL a linfocitos T iniciales de al menos aproximadamente 10:1.

[0222] En realizaciones, se pueden obtener poblaciones de CD4⁺ y CD8⁺ que son específicas de antígeno estimulando linfocitos T ingenuos o específicos de antígeno con antígeno. Por ejemplo, se pueden generar líneas o clones de células T específicas de antígeno para antígenos de citomegalovirus aislando células T de sujetos infectados y estimulando las células in vitro con el mismo antígeno. Las células T ingenuas también se pueden usar.

Evaluación y ajuste provisionales

[0223] En algunas realizaciones, los métodos incluyen evaluación y/o ajuste de las células o composición que contienen las células, en un momento posterior al inicio de la incubación o cultivo, tal como en un momento durante la incubación. La evaluación puede incluir tomar una o más mediciones de una composición o vaso que contiene las células, como evaluar la tasa de proliferación, el grado de supervivencia, el fenotipo de las células, p. ej., la expresión de uno o más marcadores de superficie o intracelulares, como proteínas o polinucleótidos, y/o evaluar la composición o recipiente para temperatura, componente(s) de medios, contenido de oxígeno o dióxido de carbono, y/o presencia o ausencia o cantidad relativa de uno o más factores, agentes, componentes y/o tipos de células, incluyendo subtipos. La evaluación en algunas realizaciones incluye determinar una relación intermedia de una pluralidad, p. ej., dos tipos de células, tales como células T CD4⁺ y CD8⁺, en la composición o recipiente incubado. En algunos aspectos, la evaluación se realiza de manera automatizada, p. ej., utilizando un dispositivo como se describe en este documento, y/o se establece con anticipación para llevarse a cabo en ciertos puntos de tiempo durante la incubación. En algunos aspectos, el resultado de la evaluación, como una relación intermedia determinada de dos tipos de células, indica que se debe hacer un ajuste, como la adición o eliminación de uno o más tipos de células.

[0224] El ajuste puede incluir el ajuste de cualquier factor o parámetro de cultivo celular, tal como temperatura, duración (tiempo) durante el cual se llevará a cabo la incubación o un paso del mismo (duración de la incubación), reposición, adición y/o eliminación de uno o más componentes en la composición que se incuba, p. ej., medios o tampón o componentes de los mismos, agentes, p. ej., nutrientes, aminoácidos, antibióticos, iones y/o factores estimulantes, como citocinas, quimiocinas, antígenos, pares de unión, proteínas de fusión, receptores solubles recombinantes, o células o tipos de células o poblaciones de células. En algunos aspectos, la eliminación o adición de varios componentes u otro ajuste se lleva a cabo de manera automatizada, p. ej., usando un dispositivo o sistema como se describe en este documento. En algunas realizaciones, el sistema se programa de tal manera que se inicia automáticamente un ajuste basado en una cierta lectura de una evaluación intermedia. Por ejemplo, en algunos casos, un sistema o dispositivo está programado para llevar a cabo una o más evaluaciones en un momento determinado; el sistema o dispositivo en tales casos puede programarse adicionalmente de modo que un resultado particular de dicha evaluación, como una relación particular de un tipo de célula a otra, inicie un ajuste particular, como la adición de uno o más de los tipos de células.

[0225] En algunos aspectos, el ajuste se lleva a cabo mediante la adición o eliminación de una manera que no interrumpe un entorno cerrado que contiene las células y las composiciones, como las válvulas de entrada y/o extracción, diseñadas para agregar o quitar componentes mientras se mantiene esterilidad, como en uno o más dispositivos o sistemas como se describe aquí.

[0226] En una realización particular, se evalúa una relación provisional de células T CD4⁺ a CD8⁺ durante el período de incubación. En algunas realizaciones, la evaluación se lleva a cabo después de 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, como entre 3 y 5 días, y/o en un momento en donde todas las células se encuentran o sospechan de estar en el ciclo celular. En algunos aspectos, la relación intermedia así determinada indica que las células T CD4⁺ o CD8⁺, como las células de la población aislada de células T CD4⁺ o población de células T CD8⁺ (p. ej., subpoblación, como las células T CD8⁺ de memoria central), deben agregarse o enriquecerse en el recipiente de cultivo o en la composición que se incuba. Por lo tanto, en algunos aspectos, la evaluación es seguida por tal adición o eliminación, típicamente una adición. En algunos aspectos, múltiples evaluaciones y posibles ajustes se llevan a cabo en el transcurso de la incubación, p. ej., de forma iterativa.

[0227] En algunas realizaciones, donde las células se manipulan, p. ej., para introducir un receptor de antígeno genéticamente modificado, la incubación en presencia de uno o más agentes estimulantes continúa durante la fase de ingeniería.

[0228] En algunas realizaciones, las células se incuban durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días, en total o antes a la ingeniería.

C. Ingeniería, receptores de antígenos modificados y células modificadas

[0229] En algunas realizaciones, los métodos incluyen la ingeniería genética de las células aisladas y/o incubadas, tal como introducir en las células genes recombinantes para la expresión de moléculas, tales como receptores, p. ej., receptores de antígeno, útiles en el contexto de la terapia adoptiva.

[0230] Entre los genes para la introducción están aquellos para mejorar la eficacia de la terapia, tal como promoviendo la viabilidad y/o función de las células transferidas; genes para proporcionar un marcador genético para la selección y/o evaluación de las células, como para evaluar la supervivencia o localización *in vivo*; genes para mejorar la seguridad, p. ej., al hacer que la célula sea susceptible a la selección negativa *in vivo* como se describe por Lupton SD et al., *Mol. y Cell Biol.*, 11: 6 (1991); y Riddell et al., *Human Gene Therapy* 3: 319-338 (1992); véanse también las publicaciones de PCT/US91/08442 y PCT/US94/05601 de Lupton et al. describe el uso de genes de fusión seleccionables bifuncionales derivados de la fusión de un marcador seleccionable positivo dominante con un marcador seleccionable negativo. Esto puede llevarse a cabo de acuerdo con técnicas conocidas (véase, p. ej., Riddell et al., *Patente de los Estados Unidos Núm. 6,040,177*, en las columnas 14-17) o variaciones de las mismas que serán evidentes para los expertos en la materia basándose en la presente divulgación.

[0231] La ingeniería generalmente incluye la introducción de un gen o genes para la expresión de un receptor de antígeno genéticamente modificado. Entre dichos receptores de antígeno se encuentran los receptores de células T (TCR) genéticamente modificados y sus componentes, y los receptores de antígeno no TCR funcionales, como los receptores de antígeno quimérico (CAR).

[0232] El receptor de antígeno en algunas realizaciones se une específicamente a un ligando en una célula o enfermedad a ser dirigida, tal como un cáncer u otra enfermedad o afección, incluidas las descritas aquí para dirigirse con los métodos y composiciones proporcionadas. Antígenos ejemplares son el receptor huérfano de tirosina quinasa ROR1, tEGFR, HeR2, LI-AM, CD19, CD20, CD22, mesotelina, CEA y antígeno de superficie de hepatitis B, receptor antinflato, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, EGP-2, EGP-4, OEPHa2, ErbB2, 3 O4, FBP, receptor de acetilcolina e fetal, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22Ralfa, IL-13R-alfa2, kdr, cadena ligera kappa, Lewis Y, molécula de adhesión de células L1, MAGE-A1, mesotelina, MUC1, MUC16, PSCA, ligandos NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, antígeno oncofetal, ROR1, TAG72, VEGF-R2, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno prostático específico, PSMA, HeR2 /neu, receptor de estrógenos, receptor de progesterona, ephrinB2, CD123, Cs -1, c-Met, GD-2 y MAGE A3 y/o moléculas biotiniladas, y/o moléculas expresadas por VIH, VHC, VHB u otros patógenos.

Receptores de antígeno

[0233] En una realización, los receptores de antígeno diseñados son CAR. Los CAR generalmente incluyen receptores genéticamente modificados que incluyen un dominio de unión a ligando extracelular unido a uno o más componentes de señalización intracelular. Dichas moléculas típicamente imitan o aproximan una señal a través de un receptor de antígeno natural y/o una señal a través de dicho receptor en combinación con un receptor coestimulador.

[0234] En algunas realizaciones, los CAR se construyen con especificidad para un marcador particular, tal como un marcador expresado en un tipo celular particular para ser dirigido por terapia adoptiva, p. ej., un marcador de cáncer. Esto se logra en algunos aspectos mediante la inclusión en la porción extracelular de la CAR una o más moléculas de unión al antígeno, como uno o más fragmentos, dominios o porciones de unión al antígeno, o uno o más dominios variables de anticuerpos, y/o moléculas de anticuerpos. En algunas realizaciones, el CAR incluye una porción o porciones de unión a antígeno de una molécula de anticuerpo, tal como un fragmento de anticuerpo de cadena sencilla (scFv) derivado de las cadenas pesadas variables (VH) y ligeras variables (VL) de un anticuerpo monoclonal (mAb).

[0235] En algunas realizaciones, el CAR comprende un dominio de cadena pesada de anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de la superficie celular de una célula o enfermedad a ser dirigida, tal como una célula tumoral o una célula cancerosa, tal como cualquiera de los antígenos diana descritos aquí o conocidos en la técnica.

[0236] En algunas realizaciones, el antígeno tumoral o la molécula de la superficie celular es un polipéptido. En algunas realizaciones, el antígeno tumoral o la molécula de la superficie celular se expresa selectivamente o se sobreexpresa en las células tumorales en comparación con las células no tumorales del mismo tejido.

[0237] En algunas realizaciones, el CAR se une a un antígeno específico de patógeno. En algunas realizaciones, los CAR son específicos para antígenos virales (tales como VIH, VHC, VHB, etc.), antígenos bacterianos y/o antígenos parásitos.

[0238] En algunos aspectos, el componente de unión, o el reconocimiento específico de antígeno está ligado a uno o más dominios de transmembrana y de señalización intracelular. En algunas realizaciones, el CAR incluye un dominio transmembrana fusionado con el dominio extracelular del CAR. En una realización, se usa el dominio transmembrana que está naturalmente asociado con uno de los dominios en el CAR. En algunos casos, el dominio transmembrana se selecciona o modifica por sustitución de aminoácidos para evitar la unión de dichos dominios a los dominios transmembrana de las mismas o diferentes proteínas de membrana superficial para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor.

[0239] El dominio transmembrana en algunas realizaciones se deriva de una fuente natural o sintética. Cuando la fuente es natural, el dominio en algunos aspectos se deriva de cualquier proteína unida a la membrana o transmembrana. Las regiones transmembrana incluyen aquellas derivadas de (es decir, comprenden al menos la(s) región(es) transmembrana) de la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD 16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD 154. Alternativamente, el dominio transmembrana en algunas realizaciones es sintético. En algunos aspectos, el dominio transmembrana sintético comprende predominantemente residuos hidrófobos tales como leucina y valina. En algunos aspectos, se encontrará un triplete de fenilalanina, triptófano y valina en cada extremo de un dominio transmembrana sintético.

[0240] En algunas realizaciones, un enlazador corto oligo- o polipéptido, p. ej., un ligador de entre 2 y 10 aminoácidos de longitud, tal como uno que contienen glicinas y serinas, p. ej., doblete glicina-serina, está presente y forma un enlace entre el dominio transmembrana y el dominio de señalización citoplasmática del CAR.

[0241] El CAR incluye generalmente componente o componentes de señalización intracelular. En algunas realizaciones, el CAR incluye un componente intracelular del complejo TCR, tal como una cadena TCR CD3 + que

media la activación de células T y la citotoxicidad, p. ej., la cadena zeta CD3. Por lo tanto, en algunos aspectos, la molécula de unión al antígeno está unida a uno o más módulos de señalización celular. En algunas realizaciones, los módulos de señalización celular incluyen dominio transmembrana CD3, dominios de señalización intracelular CD3 y/u otros dominios transmembrana CD. En algunas realizaciones, el CAR incluye además una porción de una o más moléculas adicionales tales como el receptor γ Fc, CD8, CD4, CD25 o CD16. Por ejemplo, en algunos aspectos, el CAR incluye una molécula quimérica entre CD3-zeta (CD3- ζ) o el receptor γ Fc y CD8, CD4, CD25 o CD16.

[0242] En algunas realizaciones, tras la unión de la CAR, el dominio citoplasmático o el dominio de señalización intracelular de la CAR activa al menos una de las funciones efectoras normales de la célula inmune, p. ej., la célula T diseñada para expresar la célula. Por ejemplo, en algunos contextos, el CAR induce una función de una célula T como la actividad citolítica o la actividad T-ayudante, como la secreción de citocinas u otros factores. En algunas realizaciones, una parte truncada de una señalización intracelular de dominio de un componente receptor de antígeno o molécula coestimuladora. Tal porción truncada en algunos aspectos se usa en lugar de una cadena inmunoestimuladora intacta, p. ej., si transduce la señal de la función efectora. En algunas realizaciones, el dominio o dominios de señalización intracelular incluyen las secuencias citoplasmáticas del receptor de células T (TCR), y en algunos aspectos también las de los co-receptores que en el contexto natural actúan en concierto con dicho receptor para iniciar la transducción de señales después del antígeno compromiso del receptor, y/o cualquier derivado o variante de tales moléculas, y/o cualquier secuencia sintética que tenga la misma capacidad funcional.

[0243] En el contexto de un TCR natural, la activación total requiere generalmente no sólo señalización a través del TCR, sino también una señal coestimuladora. Por lo tanto, en algunas realizaciones, para promover la activación completa, también se incluye en el CAR un componente para generar una señal secundaria o coestimuladora. La activación de las células T se describe en algunos aspectos como mediada por dos clases de secuencias de señalización citoplasmáticas: las que inician la activación primaria dependiente de antígeno a través del TCR (secuencias de señalización citoplasmática primaria) y las que actúan de manera independiente del antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora (secuencias de señalización citoplasmáticas secundarias). En algunos aspectos, el CAR incluye uno o ambos de dichos componentes de señalización.

[0244] Las secuencias de señalización citoplasmáticas primarias pueden, en algunos aspectos, regular la activación primaria del complejo TCR, ya sea de forma estimulante o inhibitoria. Las secuencias de señalización citoplasmáticas primarias que actúan de manera estimuladora pueden contener motivos de señalización que se conocen como motivos de activación basados en tirosina inmunorreceptores o ITAM. Los ejemplos de ITAM que contienen secuencias de señalización citoplasmáticas primarias incluyen las derivadas de TCR zeta, FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CDS, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. En algunas realizaciones, la(s) molécula(s) de señalización citoplasmática en el CAR contienen uno o más dominios de señalización citoplasmática, una porción de la misma o una secuencia derivada de zeta CD3.

[0245] En algunas realizaciones, el CAR incluye un dominio de señalización y/o una porción transmembrana de un receptor coestimulador, tal como CD28, 4-1BB, OX40, DAP10 e ICOS.

[0246] En ciertas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende una transmembrana CD28 y un dominio de señalización unido a un dominio intracelular CD3. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende dominios coestimuladores quiméricos CD28 y CD137, unidos a un dominio intracelular CD3. En algunas realizaciones, un CAR también puede incluir un marcador de transducción (p. ej., tEGFR). En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular de las células T citotóxicas CD8⁺ es el mismo que el dominio de señalización intracelular de las células T auxiliares CD4⁺. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular de los células T CD8⁺ citotóxicas es diferente que el dominio de señalización intracelular de las células T CD4⁺ auxiliares.

[0247] En algunas realizaciones, el CAR abarca dos o más dominios coestimuladores combinados con un dominio de activación, p. ej., dominio de activación primario, en la porción citoplasmática. Un ejemplo es un receptor que incluye componentes intracelulares de CD3-zeta, CD28 y 4-1BB.

[0248] Los CAR y la producción e introducción de los mismos pueden incluir los descritos, p. ej., mediante divulgaciones de patentes publicadas WO200014257, US6451995, US2002131960, US7446190, US8252592, EP2537416, US2013287748 y WO2013126726, y/o los descritos por Sadelain et al., Cancer Discov. 2013 abril; 3 (4): 388-398; Davila y col. (2013) PLoS ONE 8 (4): e61338; Turtle y col., Curr. Opin. Immunol., Octubre de 2012; 24 (5): 633-39; Wu et al., Cancer, 18 de marzo de 2012 (2):160-75.

[0249] En algunas realizaciones, las células T se modifican con un receptor de células T recombinantes. En algunas realizaciones, el TCR recombinante es específico para un antígeno, generalmente un antígeno presente en una célula diana, tal como un antígeno específico de tumor, un antígeno expresado en un tipo de célula particular asociado con una enfermedad autoinmune o inflamatoria, o un antígeno derivado de un patógeno viral o un patógeno bacteriano.

[0250] En algunas realizaciones, las células T están diseñadas para expresar receptores de células T (TCR) clonados a partir de células T de origen natural. En algunas realizaciones, se identifica un clon de células T de alta afinidad para

un antígeno diana (p. ej., un antígeno de cáncer), se aísla de un paciente y se introduce en las células. En algunas realizaciones, el clon TCR para un antígeno diana se ha generado en ratones transgénicos de ingeniería con los genes del sistema inmune humano (p. ej., el sistema de antígeno leucocitario humano, o HLA). Ver, p. ej., antígenos tumorales (ver, p. ej., Parkhurst et al. (2009) Clin Cancer Res. 15:169-180 y Cohen et al. (2005) J Immunol. 175: 5799-5808. En algunas realizaciones, la presentación de fagos se usa para aislar TCR contra un antígeno diana (véase, p. ej., Varela-Rohena et al. (2008) Nat Med. 14:1390-1395 y Li (2005) Nat Biotechnol. 23: 349-354.

[0251] En algunas realizaciones, después de obtener el clon de células T, las cadenas alfa y beta de TCR se aíslan y clonan en un vector de expresión génica. En algunas realizaciones, los genes alfa y beta de TCR se unen a través de un péptido de salto ribosómico picornavirus 2A para que ambas cadenas son la coexpresión. En algunas realizaciones, la transferencia genética del TCR se realiza mediante vectores retrovirales o lentivirales, o mediante transposones (véase, p. ej., Baum et al. (2006) Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy. 13:1050-1063; Frecha et al. (2010) Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy. 18:1748-1757; an Hackett et al. (2010) Molecular Therap y: The Journal of the American Society of Gene Therapy. 18: 674-683.

[0252] En algunas realizaciones, la transferencia de genes se realiza estimulando primero el crecimiento de células T y las células activadas se transducen y se expanden en cultivo hasta un número suficiente para aplicaciones clínicas.

[0253] En algunos contextos, la sobreexpresión de un factor estimulante (p. ej., una linfoquina o una citocina) puede ser tóxica para un sujeto. Por lo tanto, en algunos contextos, las células modificadas genéticamente incluyen segmentos de genes que hacen que las células sean susceptibles de selección negativa *in vivo*, como por ejemplo en la administración en inmunoterapia adoptiva. Por ejemplo, en algunos aspectos, las células están diseñadas para que puedan ser eliminadas como resultado de un cambio en el estado *in vivo* del paciente al que se administran. El fenotipo seleccionable negativo puede resultar de la inserción de un gen que confiere sensibilidad a un agente administrado, p. ej., un compuesto. Los genes seleccionables negativos incluyen el gen de timidina quinasa del virus del herpes simple tipo I (HSV-I TK) (Wigler et al., Cell II: 223, 1977) que confiere sensibilidad al ganciclovir; el gen de la hipoxantina fosforibosiltransferasa celular (HPRT), el gen de la adenina fosforibosiltransferasa celular (APRT), la citosina desaminasa bacteriana, (Mullen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89:33 (1992)).

[0254] En algunos aspectos, las células se diseñan adicionalmente para promover la expresión de citocinas, tales como citocinas proinflamatorias, p. ej., IL-2, IL-12, IL-7, IL-15, IL-21.

Introducción de los componentes genéticamente modificados

[0255] Varios métodos para la introducción de componentes genéticamente modificados, p. ej., receptores de antígeno, p. ej., CAR, son bien conocidos y pueden usarse con los métodos y composiciones proporcionadas. Los métodos ejemplares incluyen aquellos para la transferencia de ácidos nucleicos que codifican los receptores, incluso a través de virus, p. ej., retrovirales o lentivirales, transducción, transposones y electroporación.

[0256] En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos recombinantes se transfieren a las células usando partículas de virus infecciosas recombinantes, tales como, p. ej., vectores derivados del virus simio 40 (SV40), adenovirus, virus adenoasociado (AAV). En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos recombinantes se transfieren a células T usando vectores lentivirales recombinantes o vectores retrovirales, tales como vectores gamma-retrovirales (véase, p. ej., Koste et al. (2014) Gene Therapy 2014 Apr 3. doi:10.1038/gt. 2014,25; Carlens et al. (2000) Exp Hematol 28 (10):1137-46; Alonso-amino et al. (2013) Mol Ther Nucl Acids 2, e93; Park et al., Trends Biotechnol. 2011 noviembre; 29 (11): 550 - 557.

[0257] En algunas realizaciones, el vector retroviral tiene una secuencia de repetición terminal larga (LTR), p. ej., un vector retroviral derivado del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV), el virus del sarcoma mieloproliferativo (MPSV), virus de células madre embrionarias murinas (MESV), virus de células madre murinas (MSCV), virus formador de foco de bazo (SFFV) o virus adenoasociado (AAV). La mayoría de los vectores retrovirales se derivan de retrovirus murinos. En algunas realizaciones, los retrovirus incluyen los derivados de cualquier fuente de células aviar o mamífero. Los retrovirus son típicamente anfotrópica, lo que significa que una son capaces de infectar células huésped de varias especies, incluidos los humanos. En una realización, el gen a expresar reemplaza las secuencias retroviral gag, pol y/o env. Se han descrito varios sistemas retrovirales ilustrativos (p. ej., las patentes de los Estados Unidos N^{os} 5,219,740; 6,207,453; 5,219,740; Miller y Rosman (1989) BioTechniques 7: 980 -990; Miller, A. D. (1990) Human Gene Therapy 1:5-14; Scarpa et al. (1991) Virology 180: 849-852; Burns et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90: 8033-8037 y Boris-Lawrie y Temin (1993) Cur. Opin. Genet. Dciclopl. 3:102-109.

[0258] Se conocen métodos de transducción lentiviral. Se describen métodos ejemplares en, p. ej., Wang et al. al. (2012) J. Immunother. 35 (9): 689-701; Cooper et al. (2003) Blood. 101:1637-1644; Verhoeyen et al. (2009) Methods Mol Biol. 506: 97-114; y Cavalieri et al. (2003) Blood. 102 (2): 497-505.

[0259] En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos recombinantes se transfieren a las células T mediante electroporación (véase, p. ej., Chicaybam et al, (2013) PLoS ONA 8 (3): e60298 y Van Tedeloo et al. (2000) Gene Therapy 7 (16):1431-1437). En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos recombinantes se transfieren a las células

T mediante transposición (véase, p. ej., Manuri et al. (2010) *Hum Gene Ther* 21 (4): 427-437; Sharma y col. (2013) *Molec Ther Nucl Acids* 2, e74; y Huang et al. (2009) *Methods Mol Biol* 506:115-126). Otros métodos para introducir y expresar material genético en células inmunes incluyen la transfección con fosfato de calcio (p. ej., como se describe en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, NY), fusión de protoplastos, transfección catiónica mediada por liposomas; bombardeo de micropartículas facilitado por partículas de tungsteno (Johnston, *Nature*, 346: 776-777 (1990)); y coprecipitación de ADN con fosfato de estroncio (Brash et al., *Mol. Cell Biol.*, 7: 2031-2034 (1987)).

[0260] En algunas realizaciones, se introduce el mismo CAR en cada uno de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. En algunas realizaciones, se introduce un CAR diferente en cada uno de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. En algunas realizaciones, el CAR en cada una de estas poblaciones tiene una molécula de unión a antígeno que se une específicamente al mismo antígeno. En algunas realizaciones, el CAR en cada una de estas poblaciones se une a una molécula diferente. En algunas realizaciones, el CAR en cada una de estas poblaciones tiene módulos de señalización celular que difieren. En algunas realizaciones cada uno de los linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ han sido ordenados en a las células ingenuas, de memoria central, memoria efectora o efectoras antes de la transducción.

[0261] En otras realizaciones, las células, p. ej., las células T, no están diseñadas para expresar receptores recombinantes, sino que incluyen receptores de antígenos de origen natural específicos para antígenos deseados, tales como linfocitos infiltrantes de tumores y/o células T cultivadas *in vitro* o *ex vivo*, p. ej., durante la(s) etapa(s) de incubación, para promover la expansión de células que tienen especificidad de antígeno particular. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células se producen para terapia celular adoptiva mediante aislamiento de células T específicas de tumor, p. ej., linfocitos infiltrantes de tumor autólogo (TIL). El direccionamiento directo de tumores humanos utilizando linfocitos infiltrantes tumorales autólogos puede en algunos casos mediar la regresión tumoral (ver Rosenberg SA, et al. (1988) *N Engl J Med.* 319:1676-1680). En algunas realizaciones, los linfocitos se extraen de tumores resecados. En algunas realizaciones, dichos linfocitos se expanden *in vitro*. En algunas realizaciones, dichos linfocitos se cultivan con linfocinas (p. ej., IL-2). En algunas realizaciones, tales linfocitos median la lisis específica de células tumorales autólogas pero no de tumor alogénico o células normales autólogas.

[0262] En algunos aspectos, los pasos de incubación y/o ingeniería y/o los métodos generalmente dan como resultado una relación de salida deseada (o una relación que está dentro de un error tolerado o una diferencia de dicha relación), o lo hacen dentro de un cierto porcentaje del tiempo que se realizan los métodos.

D. Criopreservación

[0263] En algunas realizaciones, los métodos proporcionados incluyen etapas para congelar, p. ej., criopreservar, las células, antes o después del aislamiento, incubación y/o ingeniería. En algunas realizaciones, la congelación y posterior descongelación elimina granulocitos y, en cierta medida, los monocitos en la población celular. En algunas realizaciones, las células se suspenden en una solución de congelación, p. ej., después de una etapa de lavado para eliminar plasma y plaquetas. Puede usarse cualquiera de una variedad de soluciones y parámetros de congelación conocidos en algunos aspectos. Un ejemplo implica el uso de PBS que contiene 20% de DMSO y 8% de albúmina de suero humano (HSA), u otros medios adecuados de congelación celular. Esto luego se diluye 1:1 con medios para que la concentración final de DMSO y HSA sea del 10% y 4%, respectivamente. Luego, las células se congelan a -80°C a una velocidad de 1° por minuto y se almacenan en la fase de vapor de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido.

II Kits y sistemas

[0264] También se proporcionan sistemas, aparatos y kits útiles para realizar los métodos proporcionados. En un ejemplo, se proporciona un sistema único que lleva a cabo uno o más de los aislamientos, preparación de células, separación, p. ej., separación basada en densidad, afinidad, sensibilidad a uno o más componentes, u otra propiedad, lavado, procesamiento, incubación, cultivo y/o pasos de formulación de los métodos. En algunos aspectos, el sistema se utiliza para llevar a cabo cada uno de estos pasos en un entorno cerrado o estéril, p. ej., para minimizar el error, el manejo del usuario y/o la contaminación. En un ejemplo, el sistema es un sistema como se describe en la Solicitud de Patente Internacional, número de publicación WO2009/072003, o US 20110003380 A1.

[0265] En algunas realizaciones, el sistema o aparato lleva a cabo uno o más, p. ej., todos los pasos de aislamiento, procesamiento, ingeniería, y formulación en un sistema integrado o autónomo, y/o en un sistema automatizado o modo programable. En algunos aspectos, el sistema o aparato incluye una computadora y/o programa de computadora en comunicación con el sistema o aparato, que le permite al usuario programar, controlar, evaluar el resultado y/o ajustar varios aspectos de los pasos de procesamiento, aislamiento, ingeniería y formulación.

[0266] También se proporcionan kits para llevar a cabo los métodos proporcionados. En algunas realizaciones, los kits incluyen anticuerpos u otros pares de unión, generalmente acoplados a soportes sólidos, para el aislamiento, p. ej., para etapas de separación basadas en inmunoespecificidad, de los métodos.

[0267] En algunas realizaciones, el kit comprende anticuerpos para selección positiva y negativa, unidos a perlas

magnéticas. En una realización, el kit comprende instrucciones para llevar a cabo la selección comenzando con una muestra, tal como una muestra de PBMC, seleccionando en base a la expresión de un primer marcador de superficie, reconocido por uno o más de los anticuerpos provistos con el kit, conservando fracciones tanto positivas como negativas. En algunos aspectos, las instrucciones incluyen además instrucciones para llevar a cabo uno o más pasos de selección adicionales, comenzando con las fracciones positivas y/o negativas derivadas de las mismas, p. ej., mientras se mantienen las composiciones en un ambiente contenido y/o en el mismo recipiente de separación.

[0268] En una realización, un kit comprende anticuerpos anti-CD4, anti-CD14, anti-CD45RA, anti-CD14 y anti-CD62L, unidos a perlas magnéticas. En una realización, el kit comprende instrucciones para llevar a cabo la selección comenzando con una muestra, tal como una muestra de PBMC, seleccionando basándose en la expresión de CD4, reteniendo las fracciones positivas y negativas, y en la fracción negativa, sometiendo aún más la fracción a una selección negativa usando los anticuerpos anti-CD14, anti-CD45RA, y una selección positiva usando el anticuerpo anti-CD62L, en cualquier orden. Alternativamente, los componentes e instrucciones se ajustan de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de separación descritas en este documento.

[0269] En algunas realizaciones, el kit incluye además instrucciones para transferir las células de las poblaciones aisladas por los pasos de selección a un recipiente de cultivo, cultivo o procesamiento, mientras se mantienen las células en un sistema autónomo. En algunas realizaciones, el kit incluye instrucciones para transferir las diferentes células aisladas en una proporción particular.

III. Células, composiciones y métodos de administración

[0270] También se proporcionan células, poblaciones celulares y composiciones (incluyendo composiciones farmacéuticas y terapéuticas) que contienen las células y poblaciones, producidas por los métodos proporcionados. También se proporcionan métodos, p. ej., métodos terapéuticos para administrar las células y composiciones a sujetos, p. ej., pacientes.

[0271] Se proporcionan métodos para administrar las células, poblaciones y composiciones, y usos de tales células, poblaciones y composiciones para tratar o prevenir enfermedades, afecciones y trastornos, incluidos los cánceres. En algunas realizaciones, las células, poblaciones, y las composiciones se administran a un sujeto o paciente que tiene la enfermedad particular o condición a ser tratada, p. ej., a través de la terapia celular adoptiva, como la terapia adoptiva de células T. En algunas realizaciones, las células y composiciones preparadas por los métodos proporcionados, tales como composiciones de ingeniería y composiciones de fin de producción después de la incubación y/u otras etapas de procesamiento, se administran a un sujeto, tal como un sujeto que tiene o está en riesgo de contraer la enfermedad. o condición. En algunos aspectos, los métodos de ese modo tratan, p. ej., mejoran uno o más síntomas de la enfermedad o afección, tal como disminuyendo la carga tumoral en un cáncer que expresa un antígeno reconocido por una célula T modificada.

[0272] Los métodos para la administración de células para la terapia celular adoptiva son conocidos y pueden usarse en conexión con los métodos y composiciones proporcionadas. Por ejemplo, los métodos de terapia de células T adoptivas se describen, p. ej., en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos N° 2003/0170238 de Gruenberg et al; Patente de Estados Unidos N° 4,690,915 de Rosenberg; Rosenberg (2011) Nat Rev Clin Oncol. 8 (10): 577-85). Ver, p. ej., Themeli et al. (2013) Nat Biotechnol. 31 (10): 928-933; Tsukahara y col. (2013) Biochem Biophys Res Commun 438 (1): 84-9; Davila y col. (2013) PLoS ONA 8 (4): e61338.

[0273] En algunas realizaciones, la terapia celular, p. ej., terapia de células T adoptivas, se lleva a cabo mediante transferencia autóloga, en donde las células se aíslan y/o preparan de otro modo del sujeto que va a recibir la terapia celular, o de una muestra derivada de dicho sujeto. Por lo tanto, en algunos aspectos, las células se derivan de un sujeto, p. ej., un paciente, que necesita un tratamiento y las células, después del aislamiento y el procesamiento, se administran al mismo sujeto.

[0274] En algunas realizaciones, la terapia celular, p. ej., la terapia con células T adoptivas, se lleva a cabo mediante transferencia alogénica, en donde las células se aíslan y/o preparan de otro modo que no sea un sujeto que va a recibir o quien finalmente recibe la terapia celular, p. ej., un primer sujeto. En tales realizaciones, las células se administran luego a un sujeto diferente, p. ej., un segundo sujeto, de la misma especie. En algunas realizaciones, el primer y segundo sujetos son genéticamente idénticos. En algunas realizaciones, los sujetos primero y segundo son genéticamente similares. En algunas realizaciones, el segundo sujeto expresa la misma clase de HLA o supertipo que el primer sujeto.

[0275] En algunas realizaciones, el sujeto, p. ej., paciente, a quien se administran las células, poblaciones de células o composiciones es un mamífero, típicamente un primate, como un ser humano. En algunas realizaciones, el primate es un mono o un simio. El sujeto puede ser hombre o mujer y puede tener cualquier edad adecuada, incluidos bebés, jóvenes, adolescentes, adultos y geriátricos. En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero no primate, como un roedor.

[0276] También se proporcionan composiciones farmacéuticas para usar en tales métodos.

[0277] Entre las enfermedades, afecciones y trastornos para el tratamiento con las composiciones proporcionadas, las células, los métodos y los usos son tumores, que incluyen tumores sólidos, neoplasias hematológicas y melanomas, y enfermedades infecciosas, tales como infección con un virus u otro patógeno, p. ej., VIH, VHC, VHB, CMV y enfermedad parasitaria. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección es un tumor, cáncer, tumor maligno, neoplasia u otra enfermedad proliferativa. Dichas enfermedades incluyen, entre otras, leucemia, linfoma, p. ej., leucemia linfocítica crónica (CLL), ALL, linfoma no Hodgkin, leucemia mieloide aguda, mieloma múltiple, linfoma folicular refractario, linfoma de células del manto, linfoma de células B indolente, tumores malignos célula B, cánceres de colon, pulmón, hígado, mama, próstata, ovario, piel (incluyendo melanoma), cáncer de huesos y cerebro, cáncer de ovario, cánceres epiteliales, carcinoma de células renales, adenocarcinoma de páncreas, linfoma de Hodgkin, carcinoma cervical, cáncer colorrectal, glioblastoma, neuroblastoma, sarcoma de Ewing, meduloblastoma, osteosarcoma, sarcoma sinovial y/o mesotelioma.

[0278] En algunas realizaciones, la enfermedad o afección es una enfermedad o afección infecciosa, tal como, pero no limitado a, viral, retroviral, bacterianas y las infecciones protozoarias, inmunodeficiencia, citomegalovirus (CMV), virus Epstein-Barr (EBV), adenovirus, poliomavirus BK. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección es una enfermedad o afección autoinmune o inflamatoria, tal como artritis, p. ej., artritis reumatoide (AR), diabetes tipo I, lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, esclerodermia, tiroides autoinmune enfermedad, enfermedad de Grave, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, asma y/o una enfermedad o afección asociada con el trasplante.

[0279] En algunas realizaciones, el antígeno asociado con la enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en el receptor huérfano de tirosina quinasa ROR1, tEGFR, HeR2, LI-AM, CD19, CD20, CD22, mesotelina, CEA y superficie de hepatitis B antígeno, receptor antinflato, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, EGP-2, EGP-4, OEPHa2, ErbB2, 3 O4, FBP, receptor fetal de acetilcolina e, GD2, GD3, HMW -MAA, IL-22R-alfa, IL-13R-alfa2, kdr, cadena ligera kappa, Lewis Y, molécula de adhesión de células L1, MAGE-A1, mesotelina, MUC1, MUC16, PSCA, ligandos NKG2D, NYESO-1, MART -1, gp100, antígeno oncofetal, ROR1, TAG72, VEGF-R2, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno prostático específico, PSMA, HeR2/neu, receptor de estrógeno, receptor de progesterona, ephrinB2, CD123, Cs -1, c-Met, GD-2, y MAGE A3 y/o moléculas biotiniladas, y/o moléculas expresadas por VIH, VHC, VHB u otros patógenos.

[0280] En algunas realizaciones, las células y composiciones se administran a un sujeto en forma de una composición farmacéutica, tal como una composición que comprende las células o poblaciones de células y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas en algunas realizaciones comprenden adicionalmente otros agentes o fármacos farmacéuticamente activos, tales como agentes quimioterapéuticos, p. ej., asparaginasa, busulfano, carboplatino, cisplatino, daunorrubicina, doxorubicina, fluorouracilo, gemcitabina, hidroxiurea, metotrexato, paclitaxel, rituximab, vinblastina, vincristina, etc. En algunas realizaciones, los agentes se administran en forma de una sal, p. ej., una sal farmacéuticamente aceptable. Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen aquellas derivadas de ácidos minerales, tales como ácidos clorhídrico, bromhídrico, fosfórico, metafosfórico, nítrico y sulfúrico, y ácidos orgánicos, tales como tartárico, acético, cítrico, málico, láctico, fumárico, benzoico, glicólico, ácidos glucónico, succínico y arilsulfónico, p. ej., ácido *p*-toluenosulfónico.

[0281] La elección del portador en la composición farmacéutica está determinada en parte por el CAR o TCR, el vector o las células que expresan el CAR o el TCR, así como por el método particular utilizado para administrar el vector o las células huésped que expresan CAR. En consecuencia, hay una variedad de formulaciones adecuadas. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede contener conservantes. Los conservantes adecuados pueden incluir, p. ej., metilparabeno, propilparabeno, benzoato de sodio y cloruro de benzalconio. En algunos aspectos, se usa una mezcla de dos o más conservantes. El conservante o mezclas de los mismos están típicamente presentes en una cantidad de aproximadamente 0,0001% a aproximadamente 2% en peso de la composición total.

[0282] Además, los agentes tamponantes en algunos aspectos están incluidos en la composición. Los agentes tamponantes adecuados incluyen, p. ej., ácido cítrico, citrato de sodio, ácido fosfórico, fosfato de potasio, y varios otros ácidos y sales. En algunos aspectos, se usa una mezcla de dos o más agentes tamponantes. El agente tamponador o mezclas de los mismos están típicamente presentes en una cantidad de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 4% en peso de la composición total. Se conocen métodos para preparar composiciones farmacéuticas administrables. Los métodos ejemplares se describen con más detalle en, p. ej., Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21^a Ed. (1 de mayo de 2005).

[0283] En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica se formula como un complejo de inclusión, tal como complejo de inclusión de ciclodextrina, o como un liposoma. Los liposomas pueden servir para dirigir las células huésped (p. ej., células T o células NK) a un tejido particular. Hay muchos métodos disponibles para preparar liposomas, como los descritos en, p. ej., Szoka et al., Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 9: 467 (1980), y las patentes de EE.UU. 4,235,871, 4,501,728, 4,837,028 y 5,019,369.

[0284] En algunas realizaciones, la composición farmacéutica emplea sistemas de suministro de liberación prolongada, de liberación retardada y/o de liberación sostenida, de modo que el suministro de la composición se

produce antes y con suficiente tiempo para provocar la sensibilización del sitio tratado. Muchos tipos de sistemas de entrega de liberación están disponibles y son conocidos por los expertos en la materia. Tales sistemas en algunos aspectos pueden evitar administraciones repetidas de la composición, aumentando así la conveniencia para el sujeto y el médico.

5
[0285] En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende las células o poblaciones de células en una cantidad que es efectiva para tratar o prevenir la enfermedad o afección, tal como una cantidad terapéuticamente efectiva o profilácticamente efectiva. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los métodos de administración incluyen la administración de las células y poblaciones en cantidades efectivas. La eficacia terapéutica o profiláctica en algunas realizaciones se controla mediante la evaluación periódica de los sujetos tratados. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento se repite hasta que se produce la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles y pueden determinarse. La dosificación deseada puede administrarse mediante una única administración de bolo de la composición, mediante múltiples administraciones de bolo de la composición, o mediante administración de infusión continua de la composición.

10
[0286] En algunas realizaciones, las células se administran a una dosis deseada, que en algunos aspectos incluye una dosis deseada o número de células o tipo(s) de célula y/o una proporción deseada de tipos de células. Por lo tanto, la dosificación de células en algunas realizaciones se basa en un número total de células (o número por kg de peso corporal) y una relación deseada de las poblaciones individuales o subtipos, tales como la relación CD4⁺ a CD8⁺. En algunas realizaciones, la dosificación de células se basa en un número total deseado (o número por kg de peso corporal) de células en las poblaciones individuales o de tipos de células individuales. En algunas realizaciones, la dosificación se basa en una combinación de tales características, tales como un número deseado de células totales, relación deseada y número total deseado de células en las poblaciones individuales.

20
[0287] En algunas realizaciones, las poblaciones o subtipos de células, tales como las células T CD8⁺ y CD4⁺, se administran en o dentro de una diferencia tolerada de una dosis deseada de células totales, tal como una dosis deseada de células T. En algunos aspectos, la dosis deseada es un número deseado de células o un número deseado de células por unidad de peso corporal del sujeto al que se administran las células, p. ej., células/kg. En algunos aspectos, la dosis deseada es igual o superior a un número mínimo de células o un número mínimo de células por unidad de peso corporal. En algunos aspectos, entre las células totales, administradas a la dosis deseada, las poblaciones individuales o subtipos están presentes en o cerca de una relación de salida deseada (como la relación CD4⁺ a CD8⁺), p. ej., dentro de una cierta diferencia tolerada o error de tal proporción.

25
[0288] En algunas realizaciones, las células se administran en o dentro de una diferencia tolerada de una dosis deseada de una o más de las poblaciones individuales o subtipos de células, tales como una dosis deseada de células CD4⁺ y/o una dosis deseada de células CD8⁺. En algunos aspectos, la dosis deseada es un número deseado de células del subtipo o población, o un número deseado de tales células por unidad de peso corporal del sujeto al que se administran las células, p. ej., células/kg. En algunos aspectos, la dosis deseada es igual o superior a un número mínimo de células de la población o subtipo, o un número mínimo de células de la población o subtipo por unidad de peso corporal.

30
[0289] Por lo tanto, en algunas realizaciones, la dosificación se basa en una dosis fija deseada de células totales y una relación deseada, y/o basado en una dosis fija deseada de uno o más, p. ej., cada uno, de los sub-tipos individuales o subpoblaciones. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la dosis se basa en una dosis fija o mínima deseada de células T y una proporción deseada de células CD4⁺ a CD8⁺, y/o se basa en una dosis fija o mínima deseada de células CD4⁺ a CD8⁺.

35
[0290] En ciertas realizaciones, las células, o poblaciones individuales de subtipos de células, se administran al sujeto en un intervalo de aproximadamente un millón a aproximadamente 100 mil millones de células, tales como, p. ej., 1 millón a aproximadamente 50 mil millones de células (p. ej., aproximadamente 5 millones de células, aproximadamente 25 millones de células, aproximadamente 500 millones de células, aproximadamente 1 mil millón de células, aproximadamente 5 mil millones de células, aproximadamente 20 mil millones de células, aproximadamente 30 mil millones de células, aproximadamente 40 mil millones de células, o un rango definido por dos de los valores anteriores), como aproximadamente 10 millones a aproximadamente 100 mil millones de células (p. ej., aproximadamente 20 millones de células, aproximadamente 30 millones de células, aproximadamente 40 millones de células, aproximadamente 60 millones de células, aproximadamente 70 millones de células, aproximadamente 80 millones de células, aproximadamente 90 millones de células, aproximadamente 10 mil millones de células, aproximadamente 25 mil millones de células, aproximadamente 50 mil millones de células, aproximadamente 75 mil millones de células, aproximadamente 90 mil millones de células o un rango definido por cualquiera de los dos valores anteriores) y, en algunos casos, aproximadamente 100 millones de células a aproximadamente 50 mil millones de células (p. ej., aproximadamente 120 millones de células, aproximadamente 250 millones células, aproximadamente 350 millones de células, aproximadamente 450 millones de células, aproximadamente 650 millones de células, aproximadamente 800 millones de células, aproximadamente 900 millones de células, aproximadamente 3 mil millones de células, aproximadamente 30 mil millones de células, aproximadamente 45 mil millones de células) o cualquier valor entre estos rangos.

- 5 **[0291]** En algunas realizaciones, la dosis de células totales y/o dosis de subpoblaciones individuales de células está dentro de un intervalo de entre aproximadamente 10^4 y aproximadamente 10^9 células/kilogramos (kg) de peso corporal, tal entre 10^5 y 10^6 células/kg de peso corporal, p. ej., a aproximadamente 1×10^5 células/kg, $1,5 \times 10^5$ células/kg, 2×10^5 células/kg o 1×10^6 células/kg de peso corporal. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células se administran en, o dentro de un cierto intervalo de error, entre aproximadamente 10^4 y aproximadamente 10^9 células T/kilogramos (kg) de peso corporal, como entre 10^5 y 10^6 células T/kg de peso corporal, p. ej., aproximadamente 1×10^5 células T/kg, $1,5 \times 10^5$ células T/kg, 2×10^5 células T/kg, o 1×10^6 células T/kg de peso corporal.
- 10 **[0292]** En algunas realizaciones, las células se administran en o dentro de un cierto intervalo de error de entre aproximadamente 10^4 y aproximadamente 10^9 células $CD4^+$ y/o $CD8^+$ /kilogramos (kg) de peso corporal, tal como entre 10^5 y 10^6 células $CD4^+$ y/o $CD8^+$ /kg de peso corporal, p. ej., aproximadamente 1×10^5 células $CD4^+$ y/o $CD8^+$ /kg, $1,5 \times 10^5$ células $CD4^+$ a $CD8^+$ /kg, 2×10^5 células $CD4^+$ a $CD8^+$ /kg, o 1×10^6 células $CD4^+$ a $CD8^+$ /kg de peso corporal.
- 15 **[0293]** En algunas realizaciones, las células se administran en o dentro de un cierto intervalo de error de, mayor que, y/o al menos aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente $2,5 \times 10^6$, aproximadamente 5×10^6 , aproximadamente $7,5 \times 10^6$, o aproximadamente 9×10^6 células $CD4^+$, y/o al menos aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente $2,5 \times 10^6$, aproximadamente 5×10^6 , aproximadamente $7,5 \times 10^6$, o aproximadamente 9×10^6 células $CD8^+$ y/o al menos aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente $2,5 \times 10^6$, aproximadamente 5×10^6 , aproximadamente $7,5 \times 10^6$, o aproximadamente 9×10^6 células T. En algunas realizaciones, las células se administran en o dentro de un cierto intervalo de error de entre aproximadamente 10^8 y 10^{12} o entre aproximadamente 10^{10} y 10^{11} células T, entre aproximadamente 10^8 y 10^{12} o entre aproximadamente 10^{10} y 10^{11} células $CD4^+$, y/o entre aproximadamente 10^8 y 10^{12} o entre aproximadamente 10^{10} y 10^{11} células $CD8^+$.
- 25 **[0294]** En algunas realizaciones, las células se administran en o dentro de un intervalo tolerado de una relación de salida deseada de múltiples poblaciones o subtipos celulares, tales como células o subtipos $CD4^+$ y $CD8^+$. En algunos aspectos, la relación deseada puede ser una relación específica o puede ser un rango de relaciones. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la relación deseada (p. ej., relación de células $CD4^+$ a $CD8^+$) está entre 5 o aproximadamente 5:1 y aproximadamente 5:1 (o más de aproximadamente 1:5 y menos de aproximadamente 5:1), o entre 30 aproximadamente 1:3 y aproximadamente 3:1 (o mayor que aproximadamente 1:3 y menor que aproximadamente 3:1), como entre aproximadamente 2:1 y aproximadamente 1:5 (o más de aproximadamente 1:5 y menos de aproximadamente 2:1, como aproximadamente 5:1, 4,5:1, 4:1, 3,5:1, 3:1, 2,5:1, 2:1, 1,9:1, 1,8:1, 1,7:1, 1,6:1, 1,5:1, 1,4:1, 1,3:1, 1,2:1, 1,1:1, 1:1, 1:1,1, 1:1,2, 1:1,3, 1:1,4, 1:1,5, 1:1,6, 1:1,7, 1:1,8, 1:1,9:1:2, 1:2,5, 1:3, 1:3,5, 1:4, 1:4,5 o 1:5. En algunos aspectos, la diferencia tolerada está dentro de aproximadamente 1%, aproximadamente 2%, aproximadamente 3%, aproximadamente 4% aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50% de la proporción deseada, incluido cualquier valor entre estos rangos.
- 40 **[0295]** Las poblaciones y composiciones celulares en algunas realizaciones se administran a un sujeto utilizando técnicas de administración estándar, que incluyen la administración oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, pulmonar, transdérmica, intramuscular, intranasal, bucal, sublingual o supositorio. En algunas realizaciones, las poblaciones celulares se administran parenteralmente. El término "parenteral", como se usa en el presente documento, incluye la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, rectal, vaginal e intraperitoneal. En algunas 45 realizaciones, las poblaciones de células se administran a un sujeto usando suministro sistémico periférico mediante inyección intravenosa, intraperitoneal o subcutánea.
- 50 **[0296]** Las poblaciones de células obtenidas usando los métodos descritos en este documento en algunas realizaciones se administran conjuntamente con uno o más agentes terapéuticos adicionales o en conexión con otra intervención terapéutica, de forma simultánea o secuencial en cualquier orden. En algunos contextos, las células se administran conjuntamente con otra terapia lo suficientemente cercana en el tiempo como para que las poblaciones celulares mejoren el efecto de uno o más agentes terapéuticos adicionales, o viceversa. En algunas realizaciones, las poblaciones celulares se administran antes del uno o más agentes terapéuticos adicionales. En algunas realizaciones, las poblaciones de células se administran después de uno o más agentes terapéuticos adicionales.
- 55 **[0297]** Después de la administración de las células, la actividad biológica de las poblaciones de células modificadas genéticamente en algunas realizaciones se mide, p. ej., mediante cualquiera de varios métodos conocidos. Los parámetros a evaluar incluyen la unión específica de una célula T natural o diseñada por ingeniería genética u otra célula inmune al antígeno, *in vivo*, p. ej., por imagen, o *ex vivo*, p. ej., por ELISA o citometría de flujo. En ciertas 60 realizaciones, la capacidad de las células modificadas genéticamente para destruir las células diana puede medirse usando cualquier método adecuado conocido en la técnica, tal como ensayos de citotoxicidad descritos en, p. ej., Kochenderfer et al., J. Immunotherapy, 32 (7): 689-702 (2009), y Herman et al. J. Immunological Methods, 285 (1): 25-40 (2004). En ciertas realizaciones, la actividad biológica de las células se mide analizando la expresión y/o secreción de una o más citocinas, tales como CD 107a, IFN γ , IL-2 y TNF. En algunos aspectos, la actividad biológica se mide 65 evaluando el resultado clínico, como la reducción de la carga o carga tumoral.

[0298] En ciertas realizaciones, las células modificadas genéticamente se modifican adicionalmente de varias maneras, de modo que su eficacia terapéutica o profiláctica aumenta. Por ejemplo, el CAR o TCR modificado expresado por la población puede conjugarse directa o indirectamente a través de un conector a un resto de direccionamiento. La práctica de conjugar compuestos, p. ej., el CAR o TCR, para dirigir restos a la técnica es conocida en la técnica. Ver, p. ej., Wadwa et al., J. Drug Targeting 3:1 1 1 (1995), y la patente de los Estados Unidos 5,087,616.

IV. Definiciones

[0299] Tal como se usa en el presente documento, las formas singulares "un", "una", "el" y "ella" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, "un" o "una" significa "al menos uno" o "uno o más".

[0300] A lo largo de esta divulgación, se presentan varios aspectos del tema reivindicado en un formato de intervalo. Se debe entender que la descripción en formato de intervalo es meramente por conveniencia y brevedad y no debe ser interpretado como una limitación inflexible sobre el alcance de la materia reivindicada. En consecuencia, se debe considerar que la descripción de un rango ha revelado específicamente todos los subrangos posibles, así como los valores numéricos individuales dentro de ese rango. Por ejemplo, cuando se proporciona un rango de valores, se entiende que cada valor intermedio, entre el límite superior e inferior de ese rango y cualquier otro valor declarado o intermedio en ese rango declarado está comprendido dentro del tema reivindicado. Los límites superior e inferior de estos rangos más pequeños pueden incluirse independientemente en los rangos más pequeños, y también están incluidos en el tema reivindicado, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el rango establecido. Cuando el rango indicado incluye uno o ambos límites, los rangos que excluyen uno o ambos de los límites incluidos también se incluyen en el tema reclamado. Esto se aplica independientemente de la amplitud del rango.

[0301] El término "aproximadamente" tal como se usa en el presente documento se refiere al intervalo de error habitual para el valor respectivo fácilmente conocido por el experto en este campo técnico. La referencia a "sobre" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) realizaciones que están dirigidas a ese valor o parámetro *per se*.

[0302] Como se usan en este documento, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, "un" o "una" significan "al menos uno" o "uno o más".

[0303] A lo largo de esta descripción, se presentan varios aspectos de la materia reivindicada en un formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción en formato de rango es meramente por conveniencia y brevedad y no debe ser interpretado como una limitación inflexible en el alcance del tema reclamado. En consecuencia, se debe considerar que la descripción de un rango ha revelado específicamente todos los subrangos posibles, así como los valores numéricos individuales dentro de ese rango. Por ejemplo, cuando se proporciona un rango de valores, se entiende que cada valor intermedio, entre el límite superior e inferior de ese rango y cualquier otro valor declarado o intermedio en ese rango declarado está incluido dentro del objeto reclamado. Los límites superior e inferior de estos rangos más pequeños pueden incluirse independientemente en los rangos más pequeños, y también están incluidos en el tema reivindicado, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el rango establecido. Cuando el rango indicado incluye uno o ambos límites, los rangos que excluyen uno o ambos de los límites incluidos también se incluyen en el tema reclamado. Esto se aplica independientemente de la amplitud del rango.

[0304] Como se usa en este documento, "porcentaje (%) de aminoácidos de identidad de secuencia" y "porcentaje de identidad", cuando se usa con respecto a una (secuencia de polipéptido de referencia) la secuencia de aminoácidos se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata (p. ej., una muteína de estreptavidina) que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia de polipéptidos de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y no considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede lograr de varias maneras que están dentro de la habilidad en la técnica, p. ej., utilizando software informático disponible públicamente como BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros apropiados para alinear secuencias, incluidos los algoritmos necesarios para lograr la máxima alineación en toda la longitud de las secuencias que se comparan.

[0305] Una sustitución de aminoácidos puede incluir el reemplazo de un aminoácido en un polipéptido con otro aminoácido. Los aminoácidos generalmente pueden ser agrupados de acuerdo a las siguientes propiedades de cadena lateral común:

- (1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrofílico neutro: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácido: Asp, Glu;
- (4) básico: His, Lys, Arg;
- (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;

(6) aromático: Trp, Tyr, Phe.

[0306] Las sustituciones de aminoácidos no conservativas implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

[0307] Como se usa en el presente documento, un sujeto incluye cualquier organismo vivo, tal como humanos y otros mamíferos. Los mamíferos incluyen, entre otros, humanos y animales no humanos, incluidos animales de granja, animales deportivos, roedores y mascotas.

[0308] Como se usa en el presente documento, una composición se refiere a cualquier mezcla de dos o más productos, sustancias o compuestos, incluidas las células. Puede ser una solución, una suspensión, líquido, polvo, una pasta, acuosa, no acuosa o cualquier combinación de los mismos.

[0309] Como se usa en el presente documento, "agotamiento" cuando se refiere a uno o más tipos de células o poblaciones de células particulares, se refiere a la disminución del número o porcentaje del tipo de célula o población, p. ej., en comparación con el número total de células o el volumen de la composición, o en relación con otros tipos de células, como por selección negativa basada en marcadores expresados por la población o célula, o por selección positiva basada en un marcador no presente en la población celular o célula que se va a agotar. El término no requiere la eliminación completa de la célula, tipo de célula o población de la composición.

[0310] Como se usa en el presente documento, "enriquecer" cuando se refiere a uno o más tipos de células o poblaciones de células particulares, se refiere a aumentar el número o porcentaje del tipo de célula o población, p. ej., en comparación con el número total de células o volumen de la composición, o en relación con otros tipos de células, como por selección positiva basada en marcadores expresados por la población o célula, o por selección negativa basada en un marcador no presente en la población celular o célula que se va a agotar. El término no requiere la eliminación completa de otras células, tipo de célula o poblaciones de la composición y no requiere que las células así enriquecidas estén presentes al 100% o incluso cerca de 100% en la composición enriquecida.

[0311] Como se usa en el presente documento, los términos "tratamiento", "tratar" y "tratado" se refieren a la mejora o reducción completa o parcial de una enfermedad o afección o trastorno, o un síntoma, efecto adverso o resultado, o fenotipo asociado. En ciertas realizaciones, el efecto es terapéutico, de modo que cura parcial o completamente una enfermedad o afección o síntoma adverso atribuible a la misma.

[0312] Como se usa en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente efectiva" de un compuesto o composición o combinación se refiere a una cantidad efectiva, a las dosificaciones y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr un resultado terapéutico deseado, tal como para el tratamiento de una enfermedad, condición o trastorno y/o efecto farmacocinético o farmacodinámico del tratamiento. La cantidad terapéuticamente efectiva puede variar según factores como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del sujeto, y las poblaciones de células administradas.

[0313] Como se usa en el presente documento, una declaración de que una célula o población de células es "positiva" para un marcador particular se refiere a la presencia detectable en la célula de un marcador particular, típicamente un marcador de superficie. Cuando se refiere a un marcador de superficie, el término se refiere a la presencia de expresión de superficie detectada por citometría de flujo, p. ej., mediante tinción con un anticuerpo que se une específicamente al marcador y detectando dicho anticuerpo, en donde la tinción es detectable por citometría de flujo en un nivel sustancialmente por encima de la tinción detectada realizando el mismo procedimiento con un control de isotipo o control de activación de fluorescencia menos uno (FMO) en condiciones idénticas y/o en un nivel sustancialmente similar al de la célula que se sabe que es positiva para el marcador, y/o en un nivel sustancialmente más alto que el de una célula que se sabe que es negativa para el marcador.

[0314] Como se usa en el presente documento, una declaración de que una célula o población de células es "negativa" para un marcador particular se refiere a la ausencia de presencia sustancial detectable en o en la célula de un marcador particular, típicamente un marcador de superficie. Cuando se refiere a un marcador de superficie, el término se refiere a la ausencia de expresión de superficie detectada por citometría de flujo, p. ej., mediante tinción con un anticuerpo que se une específicamente al marcador y detectando dicho anticuerpo, en donde la tinción no se detecta mediante citometría de flujo en un nivel sustancialmente por encima de la tinción detectada llevando a cabo el mismo procedimiento con un control de isotipo coincidente o control de gating de fluorescencia menos uno (FMO) bajo por lo demás idénticas condiciones, y/o a un nivel sustancialmente menor que el de célula conocida a ser positiva para el marcador, y/o en un nivel sustancialmente similar en comparación con el de una célula que se sabe que es negativa para el marcador.

[0315] En algunas realizaciones, una disminución en la expresión de uno o marcadores se refiere a la pérdida de 10^1 en la intensidad de fluorescencia media y/o la disminución del porcentaje de células que exhiben el marcador de al menos aproximadamente el 20% de las células, 25% de las células, 30% de las células, 35% de las células, 40% de las células, 45% de las células, 50% de las células, 55% de las células, 60% de las células, 65% de las células, 70% de las células, 75% de las células, 80% de las células, 85% de las células, 90% de la célula, 95% de las células,

y 100% de las células y cualquier % entre 20 y 100% en comparación con una población celular de referencia. En algunas realizaciones, una población celular positiva para uno o marcadores se refiere a un porcentaje de células que exhiben el marcador de al menos aproximadamente 50% de las células, 55% de las células, 60% de las células, 65% de las células, 70% de las células, 75% de las células, 80% de las células, 85% de las células, 90% de las células, 95% de las células y 100% de las células y cualquier% entre 50 y 100% en comparación con una población celular de referencia.

V. Realizaciones ejemplares

[0316] Entre las realizaciones proporcionadas en el presente documento están:

1. Un método para enriquecer células T CD4⁺ o CD8⁺, incluyendo el método:

(a) realizar una primera selección en un sistema cerrado, dicha primera selección incluye enriquecer para uno de (I) células CD4⁺ y (II) células CD8⁺ de una muestra que contiene células T humanas primarias, el enriquecimiento genera así una primera población seleccionada y una población no seleccionada; y

(b) realizar una segunda selección en el sistema cerrado, dicha segunda selección incluye el enriquecimiento para la otra de (I) células CD4⁺ y (II) células CD8⁺ de la población no seleccionada, generando el enriquecimiento así una segunda población seleccionada,

en donde el método produce una composición enriquecida, que se enriquece para las células CD4⁺ y las células CD8⁺ e incluye células de la primera población seleccionada y células de la segunda población seleccionada.

2. El método de la realización 1, que incluye además (c) combinar células de la primera población seleccionada y células de la segunda población seleccionada, produciendo así la composición enriquecida y/o en donde las células CD4⁺ y CD8⁺ en la composición enriquecida están presentes en una relación iniciadora de cultivo de células CD4⁺ a células CD8⁺.

3. El método de la realización 2, en donde dicha combinación se realiza en el sistema cerrado.

4. Un método para producir células T genéticamente modificadas, el método incluye:

(a) realizar una primera selección en un sistema cerrado, dicha primera selección incluye enriquecimiento para una de (I) células CD4⁺ y (II) células CD8⁺ de una muestra conteniendo células T humanas primarias, el enriquecimiento genera así una primera población seleccionada y una población no seleccionada; y

(b) realizar una segunda selección en el sistema cerrado, dicha segunda selección incluye el enriquecimiento para la otra de (I) células CD4⁺ y (II) células CD8⁺ de la población no seleccionada, generando así el enriquecimiento de una segunda población seleccionada;

(c) incubar una composición iniciadora de cultivo, que contiene células de la primera población seleccionada y células de la segunda población seleccionada, en un recipiente de cultivo en condiciones estimulantes, generando así células estimuladas; y

(d) introducir un receptor de antígeno genéticamente modificado en células estimuladas generadas en (c),

en donde el método genera una composición de salida que incluye células T células T CD4⁺ y CD8⁺ que expresan el receptor de antígeno genéticamente modificado.

5. El método de la realización 4, que incluye además, antes del Paso (c), combinar células de la primera y segunda poblaciones de células seleccionadas para producir la composición iniciadora del cultivo y/o en donde están presentes las células CD4⁺ y CD8⁺ en la composición iniciadora del cultivo en una relación iniciadora de cultivo de células CD4⁺ a células CD8⁺.

6. El método de la realización 5, en donde dicha combinación se realiza en el sistema cerrado.

7. El método de cualquiera de las realizaciones 1-6, en donde uno o más de los pasos se llevan a cabo de manera automatizada y/o en donde el sistema cerrado está automatizado.

8. El método de cualquiera de las realizaciones 2-7, en donde la relación iniciadora del cultivo de células CD4⁺ a CD8⁺ está entre 10 o aproximadamente 10:1 y alrededor de 1:10, entre alrededor de 5:1 y alrededor de 1:5, o entre alrededor de 2:1 y alrededor de 1:2. 9. El método de cualquiera de las realizaciones 2-8, en donde la relación iniciadora del cultivo de células CD4⁺ a CD8⁺ es de 1:1 o aproximadamente.

10. El método de cualquiera de las realizaciones 2-6, en donde la muestra se obtiene de un sujeto humano y:

la relación iniciadora del cultivo de células CD4⁺ a CD8⁺ es diferente de la relación de células CD4⁺ a CD8⁺ en la muestra del sujeto; y/o

la relación iniciadora del cultivo de células CD4⁺ a CD8⁺ es al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, o al menos 50% mayor o menor que la relación de CD4⁺ a las células CD8⁺ en la muestra del sujeto.

11. El método de cualquiera de las realizaciones 1-10, en donde el enriquecimiento de células en la primera y/o segunda selección incluye realizar una selección positiva o una selección negativa basada en la expresión de un marcador de superficie celular.

5 12. El método de la realización 11, en donde el enriquecimiento de las células en la primera y/o segunda selección incluye la selección negativa, que incluye el agotamiento de las células que expresan un marcador de superficie de células no T.

13. El método de la realización 12, en donde el marcador de células no T comprende CD14.

10 14. El método de cualquiera de las realizaciones 1-13, en donde enriquecer células en la primera o segunda selección incluye realizar una pluralidad de etapas de selección positivas o negativas basadas en la expresión de un marcador o marcadores de superficie celular para enriquecer las células CD4⁺ o CD8⁺.

15. El método de cualquiera de las realizaciones 1-14, en donde las células enriquecedoras en la primera y/o segunda selección incluyen la selección basada en inmunoafinidad.

15 16. El método de la realización 15, en donde la selección basada en inmunoafinidad se efectúa poniendo en contacto células con un anticuerpo capaz de unirse específicamente a un marcador de superficie celular y recuperar células unidas al anticuerpo, efectuando así una selección positiva, o recuperando células no unidas al anticuerpo, efectuando así la selección negativa, en donde las células recuperadas se enriquecen para las células CD4⁺ o las células CD8⁺ y el anticuerpo se inmoviliza en un partícula magnética.

17. El método de cualquiera de las realizaciones 1-13, en donde la primera selección y la segunda selección se llevan a cabo en recipientes de separación separados, que están conectados operativamente.

20 18. El método de la realización 17, en donde los recipientes de separación están operativamente conectados por tubos.

25 19. El método de cualquiera de las realizaciones 15-18, en donde la selección basada en inmunoafinidad se efectúa poniendo en contacto las células con un anticuerpo inmovilizado o unido a una matriz de cromatografía de afinidad, dicho anticuerpo capaz de unirse específicamente a un marcador de superficie celular para tener un efecto positivo o selección negativa de células CD4⁺ o CD8⁺.

20. El método de la realización 19, en donde:

30 el anticuerpo incluye además uno o más pares de unión capaces de formar un enlace reversible con un reactivo de unión inmovilizado en la matriz, por lo que el anticuerpo se une reversiblemente a dicha matriz durante dicho contacto; y las células que expresan un marcador de superficie celular específicamente unido por el anticuerpo en dicha matriz son capaces de recuperarse de la matriz mediante la interrupción de la unión reversible entre el reactivo de unión y el par de unión.

35 21. El método de la realización 17, en donde:

el par de unión se selecciona entre biotina, un análogo de biotina y un péptido capaz de unirse al reactivo de unión; y el reactivo de unión se selecciona entre estreptavidina, un análogo o muteína de estreptavidina, avidina y un análogo o muteína de avidina.

40 22. El método de la realización 21, en donde:

45 el par de unión incluye una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 6; y/o el reactivo de unión es una muteína de estreptavidina que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 12, 13, 15 o 16.

50 23. El método de cualquiera de las realizaciones 19-21, que incluye además, después de contactar las células en la muestra a una matriz de cromatografía de afinidad en la primera selección y/o segunda selección, aplicando un reactivo de competencia para romper el enlace entre el par de unión y el reactivo de unión, recuperando así las células seleccionadas de la matriz.

24. El método de la realización 23, en donde el reactivo de competición es biotina o un análogo de biotina.

55 25. El método de cualquiera de las realizaciones 20-24, en donde el anticuerpo o anticuerpos en la primera y/o segunda selección tiene una tasa de disociación constante (k_{off}) para la unión y el marcador de la superficie celular mayor o mayor que aproximadamente $3 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$.

26. El método de cualquiera de las realizaciones 20-25, en donde el anticuerpo o anticuerpos en la primera y/o segunda selección tiene una afinidad por el marcador de superficie celular de una constante de disociación (K_d) en el intervalo de aproximadamente 10^{-3} a 10^{-7} o en el rango de aproximadamente 10^{-7} a aproximadamente 10^{-10} .

27. El método de cualquiera de las realizaciones 20-26, en donde la matriz de cromatografía de la primera y/o segunda selección se empaqueta en un recipiente de separación, que es una columna.

60 28. El método de la realización 19-27, en donde la matriz de cromatografía de afinidad adsorbe y/o es capaz de seleccionar al menos o al menos aproximadamente 50×10^6 células/ml, 100×10^6 células/ml, 200×10^6 células/ml o 400×10^6 células/ml.

65 29. El método de cualquiera de las realizaciones 19-28, en donde los primeros y segundos pasos de selección comprenden el uso de la matriz de cromatografía de afinidad y la matriz usada en el primer y segundo pasos de selección están en cantidades relativas suficientes para lograr la proporción de inicio del cultivo.

30. El método de cualquiera de las realizaciones 1-29, en donde el enriquecimiento para las células CD4⁺

incluye una selección positiva basada en la expresión superficial de CD4.

31. El método de cualquiera de las realizaciones 1-29, en donde el enriquecimiento para las células CD8⁺ incluye una selección positiva basada en la expresión superficial de CD8.

5 32. El método de cualquiera de las realizaciones 1-29, en donde la una de las selecciones primera y segunda que incluye el enriquecimiento para las células CD8⁺ incluye además el enriquecimiento para las células T (T_{CM}) de memoria central; y/o enriquecimiento para células que expresan un marcador seleccionado entre CD28, CD62L, CCR7, CD127 y CD27.

33. El método de cualquiera de las realizaciones 1-32, en donde:

10 la primera selección incluye el enriquecimiento para las células CD8⁺ y la segunda selección incluye el enriquecimiento para las células CD4⁺; y la primera selección incluye además enriquecimiento para células T de memoria central (T_{CM}) y/o enriquecimiento para células que expresan un marcador seleccionado entre CD28, CD62L, CCR7, CD127 y CD27.

15 34. El método de la realización 32 o la realización 33 o la realización 35, en donde el enriquecimiento para las células T (T_{CM}) de memoria central y/o el enriquecimiento para las células que expresan el marcador incluye:

20 seleccionar, de la primera y/o segunda población de células seleccionadas, que es enriquecida para células CD8⁺, células que expresan CD62L; y/o
seleccionar, de la primera y/o segunda población celular seleccionada, que está enriquecida para células CD8⁺, células que expresan CD27; y/o
seleccionar, de la primera y/o segunda población celular seleccionada, que está enriquecida para células CD8⁺, células que expresan CCR7; y/o
25 seleccionar, de la primera y/o segunda población de células seleccionada, que se enriquece para CD8⁺, células que expresan CD28; y/o
seleccionar, de la primera y/o segunda población celular seleccionada, que está enriquecida para células CD8⁺, células que expresan CD127.

30 35. El método de cualquiera de las realizaciones 1-32, en donde:

la primera selección incluye el enriquecimiento para las células CD4⁺ y la segunda selección incluye el enriquecimiento para las células CD8⁺; y
la segunda selección incluye además enriquecimiento para células T de memoria central (T_{CM}).

35 36. El método de la realización 35, en donde:

40 (I) la primera selección incluye el enriquecimiento de las células CD4⁺ por selección positiva basada en la expresión en superficie de CD4, generando de este modo la primera población seleccionada, que se enriquece para células T CD4⁺ primarias humanas, y la no muestra seleccionada;
(II) la segunda selección incluye el enriquecimiento de las células CD8⁺ y además incluye el enriquecimiento de la segunda muestra seleccionada para las células T (T_{CM}) de memoria central, en donde el enriquecimiento para las células T (T_{CM}) de la memoria central incluye:

45 selección negativa para agotar las células que expresan un marcador de superficie presente en células T ingenuas y selección positiva para células que expresan un marcador de superficie presente en células T (T_{CM}) de memoria central y no presente en otra subpoblación de células T de memoria; o
selección positiva para células que expresan un marcador de superficie presente en células T de memoria central y no presente en células T ingenuas y selección positiva para células que expresan un marcador de superficie presente en células T de memoria central (T_{CM}) y no presentes en otra subpoblación de células T de memoria;
50 generando así células T primarias humanas CD8⁺ enriquecidas para células T_{CM}.

55 37. El método de la realización 36, en donde:

el marcador presente en las células T ingenuas comprende CD45RA; y
el enriquecimiento para las células T (T_{CM}) de memoria central incluye la selección negativa para agotar las células que expresan CD45RA y la selección positiva para las células que expresan un
60 marcador de superficie presente en las células T (T_{CM}) de memoria central y no presente en otra subpoblación de células T de memoria.

38. El método de la realización 37, en donde:

65 el marcador de superficie presente en las células T de memoria central y no presente en las células T ingenuas comprende CD45RO;

el enriquecimiento para las células T (T_{CM}) de memoria central incluye la selección positiva para las células que expresan CD45RO y la selección positiva para las células que expresan el marcador de superficie presente en las células T (T_{CM}) de memoria central y no presente en otra subpoblación de células T de memoria.

5 39. El método de cualquiera de las realizaciones 36-38, en donde el marcador de superficie presente en las células T (T_{CM}) de memoria central y no presente en otra subpoblación de células T de memoria se selecciona del grupo que consiste en CD62L, CCR7, CD27, CD127 y CD44.

10 40. El método de la realización 39, en donde el marcador de superficie presente en las células T (T_{CM}) de memoria central y no presente en otra subpoblación de células T de memoria es CD62L.

41. El método de cualquiera de las realizaciones 32-40, en donde la población de CD8⁺ en la composición enriquecida o la composición que inicia el cultivo incluye al menos 50% de células T (T_{CM}) de memoria central o incluye menos del 20% de células T (T_N) o incluye al menos 80% de células CD62L⁺.

15 42. Un método para enriquecer las células T CD4⁺ y CD8⁺, el método incluye el contacto de las células de una muestra que contiene células T humanas primarias con un primer reactivo de inmunofinidad que se une específicamente a CD4 y un segundo reactivo de inmunofinidad que se une específicamente a CD8 en una composición de incubación, bajo condiciones por las cuales los reactivos de inmunofinidad se unen específicamente a las moléculas CD4 y CD8, respectivamente, en la superficie de las células en la muestra;

20 y recuperar células unidas al primer y/o segundo reactivo de inmunofinidad, generando así una composición enriquecida que incluye células CD4⁺ y células CD8⁺ en una relación iniciadora de cultivo, en donde: el primer y/o segundo reactivo de inmunofinidad están presentes en la composición de incubación en una concentración de rendimiento subóptima, por lo que la composición enriquecida contiene menos del 70% de las células CD4⁺ totales en la composición de incubación y/o menos del 70% de las células CD8⁺ en la composición de incubación, produciendo así una composición enriquecida para células T CD4⁺ y CD8⁺.

25 43. Un método para producir células T genéticamente modificadas, incluyendo el método:

(a) enriquecer las células T humanas primarias a partir de una muestra que contiene células T humanas primarias, incluyendo:

30 poner en contacto las células de dicha muestra con un primer reactivo de inmunofinidad que se une específicamente a CD4 y un segundo reactivo de inmunofinidad que se une específicamente a CD8 en una composición de incubación, en condiciones por las cuales los reactivos de inmunofinidad se unen específicamente a moléculas CD4 y CD8, respectivamente, en la superficie de las células en la muestra; y recuperar células unidas al primer y/o segundo reactivo de inmunofinidad, generando así una composición enriquecida que incluye células CD4⁺ y células CD8⁺ en una relación iniciadora de cultivo, en donde: el primer y/o segundo reactivo de inmunofinidad están presentes en la composición de incubación en una concentración de rendimiento subóptima, por lo que la composición enriquecida contiene menos del 70% del total de células CD4⁺ en la composición de incubación y/o menos del 70% de las células CD8⁺ en la composición de incubación; y

45 (b) incubar células de la composición enriquecida en una composición de iniciación de cultivo en un recipiente de cultivo en condiciones estimulantes, generando así células estimuladas, en donde las células están en o sustancialmente en la relación de iniciación de cultivo; y

(c) la introducción de un receptor de antígeno por ingeniería genética en células estimuladas de (b), generando de este modo una composición de salida que incluye células T CD4⁺ y células T CD8⁺ que expresan el antígeno diseñado genéticamente receptor.

50 44. El método de la realización 42 o la realización 43, en donde el enriquecimiento para células T humanas primarias se realiza un sistema cerrado.

55 45. El método de cualquiera de las realizaciones 42-44, en donde el primer y segundo reactivo de inmunofinidad están presentes en la composición de incubación a una concentración de rendimiento subóptima, por lo que la composición enriquecida contiene menos del 70% del total de células CD4⁺ en la composición de incubación y menos del 70% del total de células CD8⁺ en la composición de incubación.

46. El método de cualquiera de las realizaciones 42-45, en donde:

60 el primer reactivo de inmunofinidad está presente en la composición de incubación a una concentración de rendimiento subóptima, por lo que la composición enriquecida contiene menos del 60%, menos del 50%, menos del 40%, menos del 30% o menos del 20% del total de células CD4⁺ en la composición de incubación; y/o el segundo reactivo de inmunofinidad está presente en la composición de la incubación a una concentración de rendimiento sub-óptima, con lo que la composición enriquecida contiene menos de 60%, menos de 50%, menos de 40%, menos de 30% o menos del 20% del total de células CD8⁺ en la composición de incubación.

65

47. El método de realización cualquiera de las realizaciones 42-46, en donde la muestra contiene al menos 1×10^9 células T CD3⁺.

5 48. El método de cualquiera de las realizaciones 42-47, en donde la concentración de uno de los reactivos de inmunofinidad primero y segundo en la composición de incubación es mayor que la del otro, por lo que la mayor concentración produce un mayor rendimiento en la composición enriquecida de células CD4⁺ o células CD8⁺, respectivamente, en comparación con el rendimiento de la otra de las células CD4⁺ o CD8⁺, produciendo así la relación iniciadora del cultivo en la composición enriquecida.

49. El método de la realización 48, en donde:

10 la concentración de uno de los reactivos de inmunofinidad primero y segundo es mayor, en comparación con la concentración del otro de los reactivos de inmunofinidad primero y segundo, en al menos 1,2 veces, 1,4 veces, 1,6 veces, 1,8 veces, 2,0 veces, 3,0 veces, 4,0 veces, 5,0 veces, 6,0 veces, 7,0 veces, 8,0 veces, 9,0 veces o 10 veces; y/o el mayor rendimiento en la concentración enriquecida es mayor en 1,2 veces, 1,4 veces, 1,6 veces, 1,8 veces, 2,0 veces, 3,0 veces, 4,0 veces, 5,0 veces, 6,0 veces, 7,0 veces, 8,0 veces, 9,0 veces o 10 veces.

50. El método de cualquiera de las realizaciones 42-49, en donde la relación de iniciación de cultivo de células CD4⁺ a CD8⁺ está entre aproximadamente 10:1 y aproximadamente 1:10, entre aproximadamente 5:1 y aproximadamente o aproximadamente 1:5 o está entre o aproximadamente 2:1 y aproximadamente 1:2.

20 51. El método de cualquiera de las realizaciones 42-50, en donde la relación iniciadora del cultivo de células CD4⁺ a CD8⁺ es de 1:1 o aproximadamente.

52. El método de cualquiera de las realizaciones 42-51, en donde:

25 la relación iniciadora del cultivo de células CD4⁺ a CD8⁺ es diferente de la relación de células CD4⁺ a CD8⁺ en la muestra del sujeto; y/o la relación iniciadora del cultivo de células CD4⁺ a CD8⁺ es al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40% o al menos 50% mayor o menor que la relación de CD4⁺ a las células CD8⁺ en la muestra del sujeto.

30 53. El método de cualquiera de las realizaciones 42-52, en donde más del 95% o más del 98% de las células en la composición de iniciación del cultivo son células CD4⁺ y células CD8⁺.

54. El método de cualquiera de las realizaciones 42-53, en donde cada uno de los reactivos de inmunofinidad contiene un anticuerpo.

35 55. El método de la realización 54, en donde el anticuerpo se inmoviliza en la superficie exterior de una esfera.

56. El método de la realización 55, en donde la esfera es una perla magnética.

57. El método de la realización 55 o la realización 56, en donde:

40 el anticuerpo contiene uno o más pares de unión capaces de formar un enlace reversible con un reactivo de unión inmovilizado en la esfera, por lo que el anticuerpo se inmoviliza reversiblemente a dicha esfera; y el método incluye además después de contactar las células en la muestra al primer y segundo reactivo de inmunofinidad, la aplicación de un reactivo de la competencia para interrumpir la unión entre el par de unión y reactivo de unión, con lo que la recuperación de las células seleccionadas de la esfera.

58. El método de la realización 57, en donde:

50 el par de unión se selecciona entre biotina, un análogo de biotina o un péptido capaz de unirse al reactivo de unión; y el reactivo de unión se selecciona entre estreptavidina, un análogo o muteína de estreptavidina, avidina, un análogo o muteína de avidina.

59. El método de la realización 58, en donde:

55 el par de unión contiene un péptido que incluye la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 6 y/o el reactivo de unión se estreptavidina muteína que incluye la secuencia de aminoácidos establecidas en SEQ ID NO:12, 13, 15 o 16.

60. El método de la realización 58 o modo de realización 59, en donde:

60 el reactivo de unión es un multímero que incluye uno o más monómeros de estreptavidina o una muteína de estreptavidina; y el par de unión es un péptido que incluye una disposición secuencial de al menos dos módulos, cada uno capaz de unirse reversiblemente con al menos un monómero del reactivo de unión.

65 61. El método de la realización 60, en donde el par de unión contiene la secuencia de aminoácidos establecida

en cualquiera de las SEQ ID NO: 7-10.

62. El método de cualquiera de las realizaciones 57-61, en donde el reactivo de competición es biotina o un análogo de biotina.

63. El método de cualquiera de las realizaciones 42-63, en donde el anticuerpo o anticuerpos en la primera y/o segunda selección tienen una constante de velocidad de disociación (k_{off}) para la unión entre el anticuerpo y el marcador de la superficie celular mayor o mayor que aproximadamente $3 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$.

64. El método de cualquiera de las realizaciones 42-63, en donde el anticuerpo o anticuerpos en la primera y/o segunda selección tiene una afinidad con una constante de disociación (K_d) en el intervalo de aproximadamente 10^{-3} a 10^{-7} o con una constante de disociación en el rango de aproximadamente 10^{-7} a aproximadamente 10^{-10} .

65. El método de cualquiera de las realizaciones 42-63, en donde uno o más pasos se llevan a cabo de manera automatizada y/o en donde el sistema cerrado está automatizado.

66. El método de cualquiera de las realizaciones 2, 3 y 5-41, que incluye:

antes de realizar la primera selección y/o segunda selección, determinar la relación de células T CD4⁺ a CD8⁺ en la muestra; y basado en la proporción de células T CD4⁺ a CD8⁺ en la muestra, ajustando la primera y/o segunda selección para producir la composición que incluye las células CD4⁺ y las células CD8⁺ en la proporción de iniciación del cultivo.

67. El método de la realización 66, en donde:

la primera y/o segunda selección incluye una selección basada en inmunoafinidad que incluye una matriz de cromatografía de afinidad; y ajustar la primera y/o segunda selección incluye elegir la cantidad de matriz de cromatografía de afinidad en la primera y/o segunda selección suficiente para lograr la relación de iniciación del cultivo.

68. El método de cualquiera de las realizaciones 42-65, que incluye:

antes de poner en contacto las células de la muestra con el primer y segundo reactivo de inmunoafinidad, determinar la proporción de células T CD4⁺ a CD8⁺ en la muestra; y en base a la proporción de células T CD4⁺ a CD8⁺ en la muestra, elegir la concentración del primer y/o segundo reactivo de inmunoafinidad para producir la composición enriquecida que incluye las células CD4⁺ y las células CD8⁺ en la relación de iniciación del cultivo.

69. El método de cualquiera de las realizaciones 1-68, en donde el método da como resultado una composición de salida que incluye una relación de células CD4⁺ a CD8⁺ que está entre aproximadamente 2:1 y aproximadamente 1:5.

70. El método de la realización 69, en donde la proporción de células CD4⁺ a CD8⁺ en la composición de salida es 1:1 o es aproximadamente 1:1.

71. El método de cualquiera de las realizaciones 1-70, en donde la muestra se obtiene de un sujeto.

72. El método de la realización 71, en donde el sujeto es un sujeto al que se administrarán dichas células T genéticamente modificadas o células para terapia adoptiva.

73. El método de la realización 72, en donde el sujeto es un sujeto distinto de un sujeto al que se administrarán dichas células T genéticamente modificadas o células para terapia adoptiva.

74. El método de cualquiera de las realizaciones 1-73, en donde la muestra es sangre o una muestra derivada de sangre.

75. El método de cualquiera de las realizaciones 1-74, en donde la muestra es una muestra de glóbulos blancos.

76. El método de cualquiera de las realizaciones 1-75, en donde la muestra es una aféresis, una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC) o una muestra de leucaféresis.

77. El método de cualquiera de las realizaciones 4-41 o 43-76, en donde la incubación de la composición en un recipiente de cultivo en condiciones estimulantes se realiza antes de, durante y/o posterior a la introducción de un receptor de antígeno genéticamente modificado.

78. El método de cualquiera de las realizaciones 4-41 o 43-76, en donde la incubación de la composición en un recipiente de cultivo en condiciones estimulantes se realiza antes, durante y después de la introducción de un receptor de antígeno genéticamente modificado.

79. El método de cualquiera de las realizaciones 4-41 o 43-78, en donde las condiciones estimulantes comprenden condiciones por las cuales proliferan las células T de la composición.

80. El método de cualquiera de las realizaciones 4-41 o 43-79, en donde la condición estimulante incluye un agente capaz de activar uno o más dominios de señalización intracelular de uno o más componentes de un complejo TCR.

81. El método de la realización 80, en donde el uno o más componentes del complejo TCR contienen la cadena zeta CD3.

82. El método de cualquiera de las realizaciones 4-41 o 43-81, en donde la afección estimulante contiene la presencia de un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28, un anticuerpo anti-4-1BB y/o una citocina.

83. El método de la realización 82, en donde el anticuerpo anti-CD3 y/o el anticuerpo anti-CD28 está presente en la superficie de un soporte sólido.

84. El método de la realización 83, en donde la citocina incluye IL-2, IL-15, IL-7 y/o IL-21.

5 85. El método de cualquiera de las realizaciones 4-41 o 43-84, en donde el receptor de antígeno genéticamente modificado incluye un receptor de células T (TCR) o un receptor de antígeno funcional no TCR.

86. El método de la realización 85, en donde el receptor se une específicamente a un antígeno expresado por células de una enfermedad o condición a ser tratada.

10 87. El método de cualquiera de las realizaciones 85 u 86, en donde el receptor de antígeno es un receptor de antígeno quimérico (CAR).

88. El método de la realización 87, en donde el CAR contiene un dominio de reconocimiento de antígeno extracelular y un dominio de señalización intracelular que incluye una secuencia que contiene ITAM y un dominio de señalización intracelular de una molécula coestimuladora de células T.

15 89. Un método de tratamiento, incluyendo dicho método:

(a) producir una composición de salida que incluye células T CD4⁺ y CD8⁺ según cualquiera de las realizaciones 1-88; y

(b) administrar células de la composición de salida a un sujeto.

20 90. El método de la realización 89, en donde la muestra de la que se aíslan las células se deriva del sujeto al que se administran las células.

91. Una composición de células producidas por el método de cualquiera de las realizaciones 1-88.

92. La composición de la realización 91, que incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 93. Un método de tratamiento, incluyendo dicho método administrar a un sujeto una composición de células de la realización 91 o 92.

94. El método de la realización 93, en donde el receptor de antígeno genéticamente modificado se une específicamente a un antígeno asociado con la enfermedad o afección.

95. El método de tratamiento de la realización 94, en donde la enfermedad o afección es un cáncer.

30 96. La composición de la realización 91 o la realización 92 para usar en el tratamiento de una enfermedad o afección en un sujeto.

97. Uso de una composición de la realización 91 o la realización 92 para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto.

98. La composición de la realización 96 o el uso de la realización 97, en donde el receptor de antígeno genéticamente modificado se une específicamente a un antígeno asociado con la enfermedad o afección.

35 99. La composición o uso de cualquiera de las realizaciones 96-98, en donde la enfermedad o afección es un cáncer.

100. Un sistema de aparato cerrado para la purificación de células diana, que incluye:

40 a) una primera matriz de cromatografía de afinidad que incluye un primer agente de unión inmovilizado sobre la misma, cuyo agente de unión se une específicamente a un primer marcador de superficie celular presente en una primera célula, en donde la primera afinidad la matriz de cromatografía está operativamente conectada a un depósito de almacenamiento que incluye una muestra de células a través de una primera conexión operable, dicha primera conexión operable capaz de permitir el paso de células desde el depósito de almacenamiento a la primera matriz de cromatografía de afinidad y en donde la primera matriz de cromatografía de afinidad está operativamente conectada a un recipiente de salida a través de una segunda conexión operable; y

45 b) una segunda matriz de cromatografía de afinidad que incluye un segundo agente de unión inmovilizado sobre ella, cuyo segundo agente de unión se une específicamente a un segundo marcador de superficie celular presente en una segunda célula, en donde la primera matriz de cromatografía de afinidad está conectada operativamente a través de una tercera conexión operable capaz de permitir el paso de células que han pasado a través de la primera matriz de cromatografía de afinidad y no unida al primer agente de unión al segunda matriz de cromatografía de afinidad, y la segunda matriz de cromatografía de afinidad está operativamente conectada a través de una cuarta conexión operable al recipiente de salida, la cuarta conexión operable capaz de permitir el paso de células que se han unido a la primera y/o segunda matriz de cromatografía de afinidad y han sido eluidas de la primera y/o segunda matriz de cromatografía de afinidad, y la segunda matriz de cromatografía de afinidad está unida operativamente, a través de la quinta conexión operable, a un recipiente de residuos, siendo capaz la quinta conexión operable de permitir el paso de las células habiendo pasado a través de la primera matriz de cromatografía de afinidad y no unida al primer agente de unión y habiendo pasado a través de la segunda matriz de cromatografía de afinidad y no unida al

50 c) el recipiente de salida; y

55 d) el recipiente de residuos,

60 en donde el sistema está configurado para permitir, dentro del sistema cerrado, colección de, en el recipiente

de salida en una sola composición, (I) las células se han unido y han recuperado de la primera matriz de cromatografía de afinidad y (II) células que pasaron y no se unieron a la primera matriz de cromatografía de afinidad y se unieron y recuperaron de la segunda matriz de cromatografía.

101. El aparato cerrado de la realización 100, en donde una o más de dichas conexiones operables contienen tubos que conectan el depósito de almacenamiento, la primera matriz de cromatografía de afinidad, la segunda matriz de cromatografía de afinidad y/o el recipiente de cultivo.

102. El aparato cerrado de la realización 101, en donde el tubo está conectado a una llave de paso, válvula o abrazadera.

103. El sistema de aparato cerrado de cualquiera de las realizaciones 100-102, en donde:

(a) la primera matriz de cromatografía de afinidad es una matriz de cromatografía de afinidad CD4⁺ o una matriz de cromatografía de afinidad CD8⁺; y

(b) la segunda matriz de cromatografía de afinidad es la otra de la matriz de cromatografía de afinidad de CD4⁺ o la matriz de cromatografía de afinidad CD8⁺.

104. El sistema de aparato cerrado de cualquiera de las realizaciones 100-103, que incluye además:

d) una tercera matriz de cromatografía de afinidad que incluye un tercer agente de unión inmovilizado sobre la misma, cuyo agente de unión se une específicamente a un tercer marcador de superficie celular, por lo que el tercer agente de unión es capaz de unir células que expresan el tercer marcador de superficie celular, en donde la tercera conexión operable conecta adicionalmente de manera operable la tercera matriz de cromatografía de afinidad a la primera matriz y una sexta conexión operable conecta operablemente la tercera matriz de cromatografía de afinidad al contenedor de salida, de modo que la sexta operable la conexión es capaz de permitir el paso de células que se unieron y se recuperaron de la primera matriz y que se unieron y se recuperaron de la tercera matriz al contenedor de salida, y la quinta conexión operable conecta de manera operativa la tercera matriz de cromatografía de afinidad con el contenedor de desechos, de modo que la quinta conexión operable sea capaz de permitir que las células pasen y que no están unidas a la tercera columna al contenedor de residuos.

105. El sistema de aparato cerrado de cualquiera de las realizaciones 100-103, que incluye además:

d) una tercera matriz de cromatografía de afinidad que incluye un tercer agente de unión inmovilizado sobre la misma, cuyo agente de unión se une específicamente a un tercer marcador de superficie celular, por lo que la tercera matriz de cromatografía de afinidad es capaz de unir células que expresan el tercer marcador de superficie celular, en donde la segunda conexión operable conecta adicionalmente de manera operable la tercera matriz de cromatografía de afinidad a la primera matriz y al contenedor de salida, de modo que la segunda conexión operable es capaz de permitir que las células se unan y se ha recuperado de la primera matriz y se ha unido y se ha recuperado de la tercera matriz al contenedor de salida.

106. El sistema de aparato cerrado de la realización 104 o 105, en donde:

la primera matriz de cromatografía de afinidad incluye un agente de unión que se une específicamente a CD8;

la segunda matriz de cromatografía de afinidad incluye un agente de unión que se une específicamente a CD4; y

la tercera matriz de cromatografía de afinidad incluye un agente de unión que se une específicamente a un marcador expresado en células T (T_{CM}) de memoria central.

107. El sistema de aparato cerrado de la realización 106, en donde el agente de unión de la tercera matriz de cromatografía de afinidad se une selectivamente a un marcador de superficie celular seleccionado entre CD62L, CD45RA, CD45RO, CCR7, CD27, CD127 y CD44.

108. El sistema de aparato cerrado de cualquiera de las realizaciones 100-107, en donde uno o más o todos los matrices de cromatografía de afinidad están más conectados operativamente a un depósito de tampón de elución que incluye uno o más reactivos de competencia.

109. El sistema de aparato cerrado de cualquiera de las realizaciones 100-107, en donde el reactivo de competencia es uno o más del grupo que consiste en biotina, un análogo de biotina, y un péptido capaz de unirse a la matriz de cromatografía.

110. El sistema de aparato cerrado de cualquiera de las realizaciones 100-107, en donde una o más o todas las conexiones operables tercera, cuarta o sexta incluyen además una cámara de retirada de agente de competición.

111. El sistema de aparato cerrado de la realización 110, en donde la cámara de retirada del agente de competencia contiene además un reactivo de unión.

112. El sistema de aparato cerrado de la realización 111, en donde el reactivo de unión incluye uno o más del grupo que consiste en estreptavidina, un análogo o muteína de estreptavidina, avidina y un análogo o muteína de avidina.

113. El sistema de aparato cerrado de cualquiera de las realizaciones 100-112, en donde uno o más o todos los agentes de unión es un anticuerpo.

114. El sistema de aparato cerrado de cualquiera de las realizaciones 100-112, en donde el uno o más o todos los agentes de unión están unidos reversiblemente a la matriz de cromatografía de afinidad.

VI. EJEMPLOS

[0317] Los siguientes ejemplos se incluyen solo con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención.

5 **Ejemplo 1: Generación de una composición de células T CD4⁺ y CD8⁺ utilizando un flujo de proceso único por separación inmunomagnética para ingeniería genética y terapia celular adoptiva**

10 [0318] En un método ejemplar, una población de células T CD4⁺ y una población de células T CD8⁺, enriquecida para las células T de memoria central, se aíslan de una muestra de producto de aféresis, y posteriormente se incuban y manipulan, seguido de la administración a un sujeto. El procedimiento de aislamiento se lleva a cabo utilizando una única corriente de proceso por separación inmunomagnética utilizando el sistema CliniMACS® Prodigy. El proceso se simplifica en comparación con otros métodos, en los que las células CD4⁺ se separan de una primera fracción de aféresis y las células CD8⁺ se separan y se agotan/enriquecen aún más, de una segunda fracción de aféresis, usando un dispositivo Prodigy CliniMACS® y tres conjuntos de tubos separados.

15 [0319] El proceso simplificado se realiza usando un conjunto de tubos para el aislamiento de las poblaciones de células CD4⁺ y CD8⁺, sin transferir las poblaciones de células de un recipiente (p. ej., conjunto de tubos) a otro.

20 [0320] La población de células CD4⁺ se aísla incubando una muestra de aféresis con un reactivo CliniMACS® CD4. Las células se separan a continuación por el dispositivo de CliniMACS® Prodigy configurado para ejecutar un programa de enriquecimiento, y las dos fracciones de células (es decir, la fracción de células CD4⁺ enriquecidas inmunomagnéticamente seleccionadas y la fracción de células de flujo continuo) se conservan. La fracción enriquecida (positiva) es una población aislada de células T CD4⁺. Se aísla una población de células T CD8⁺ incubando la fracción de flujo (negativa) con un reactivo CliniMACS® CD14 y un reactivo CliniMACS® CD45RA o reactivo CD19. El dispositivo CliniMACS® Prodigy está configurado para ejecutar un programa de agotamiento. La mezcla de células/reactivos se separa luego con el dispositivo CliniMACS® Prodigy utilizando el mismo conjunto de tubos utilizado en el primer paso de separación. La fracción de flujo (negativa) a partir de la cual se han agotado las células CD14 +/CD45RA + o CD 14 +/CD 19+ se incuba con el reactivo CliniMACS® CD62L. La mezcla de células/reactivos se separa utilizando el dispositivo CliniMACS® Prodigy que ejecuta un programa de enriquecimiento utilizando el mismo conjunto de tubos. La fracción positiva es una población de células CD8⁺ aislada enriquecida para células de memoria central.

35 [0321] Las poblaciones aisladas de CD4⁺ y CD8⁺ se combinan en el mismo recipiente de cultivo en una composición iniciadora de cultivo en una relación de iniciación de cultivo. La relación de iniciación de cultivo está diseñada para lograr una relación de salida deseada particular, o una relación que está dentro de un cierto rango de error tolerado de dicha relación de salida deseada, siguiendo los pasos de incubación y/o ingeniería, o diseñada para hacerlo un cierto porcentaje del tiempo. Las células se incuban en condiciones estimulantes, tales como el uso de perlas anti-CD3/anti-CD28 en presencia de IL-2 (100 UI/ml) durante 72 horas a 37°C, dentro del sistema Prodigy.

40 [0322] La composición celular se evalúa y/o ajusta periódicamente de forma opcional una o más veces después del inicio de la incubación o cultivo, tal como en un momento durante la incubación. La evaluación incluye la medición de tasa de proliferación, el grado de medición de la supervivencia, la determinación del fenotipo, p. ej., la expresión de uno o más marcadores de superficie o intracelulares, tales como proteínas o polinucleótidos, y/o el ajuste de la composición o recipiente para la temperatura, componente(s) de medios, oxígeno o contenido de dióxido de carbono, y/o presencia o ausencia o cantidad o cantidad relativa de uno o más factores, agentes, componentes y/o tipos de células, incluidos los subtipos.

45 [0323] Las células así incubadas se modifican genéticamente, introduciendo en las células genes recombinantes para la expresión de receptores de antígeno recombinante, tales como receptores de antígeno quimérico (CAR) o TCR recombinantes. La introducción se realiza en el entorno contenido dentro del dispositivo CliniMACS® Prodigy, con células CD4⁺ y CD8⁺ presentes en la misma composición y recipiente. El método da como resultado una composición de salida con células T CD4⁺ y CD8⁺ modificadas.

50 **Ejemplo 2: Generación de una composición de células T CD4⁺ y CD8⁺ por purificación secuencial en un sistema cerrado**

55 [0324] Este ejemplo demuestra un método ejemplar de enriquecimiento o selección para una población de células T CD4⁺ y una población de células T CD8⁺ de una muestra de producto de aféresis obtenida de un sujeto. El proceso se realiza utilizando un sistema cerrado con múltiples columnas de cromatografía para la selección positiva secuencial de las poblaciones de células T CD4⁺ y CD8⁺ de la misma muestra inicial.

A. Enriquecimiento para la población de células T CD4⁺ y la población de células T CD8⁺

65 [0325] En el proceso ejemplar, representado en la Figura 1A, se disponen una serie de columnas de selección inmunocromatográfica y columnas de retirada en un aparato cerrado **14** conectado de manera operativa entre sí y una bomba peristáltica **8** a través de varias tuberías y válvulas **13** para controlar el flujo de la fase líquida.

[0326] La primera columna de selección **1** contiene un volumen elegido de una matriz de cromatografía de afinidad **3**, tal como una resina de agarosa, tal como una resina como se describe en la solicitud de patente estadounidense publicada N^o US2015/0024411 para el aislamiento de células T, como una con un límite de exclusión diseñado para ser mayor que el tamaño de una célula T, como una agarosa obtenida de Agarose Beads Technologies, Madrid, España, con un tamaño de exclusión reducida en comparación con agarosa de SuperflowTM, que tiene un tamaño de exclusión de 6 X 10⁶ Daltons. La matriz en la primera columna está unida a multímeros de Strep-Tactin® (p. ej., que contiene un mutante de estreptavidina establecido en cualquiera de las SEQ ID NO:12, 13, 15 o 16, IBA GmbH, Alemania o como se describe en la Solicitud PCT publicada internacional N^{os} WO 2014/076277). La segunda columna de selección **2** contiene un volumen elegido de una matriz de cromatografía de afinidad **4**, tal como una resina de agarosa, tal como una resina como se describe anteriormente, que también está unida a multímeros de Strep-Tactin®.

[0327] Un depósito que contiene un fragmento de anti-CD8 Fab **18** se carga a ejecutar a través de la bomba **8**, la tubería, y las válvulas **13** de tal manera que el anti-CD8 Fab se aplica a la primera columna de selección **1**, mediante el cual el anti-CD8 Fab se convierte inmovilizado en Strep-Tactin® en la matriz de afinidad **3** con un Twin Strep-Tag® (p. ej., establecido en SEQ ID NO:10; IBA GmbH) en el fragmento Fab, que se fusiona con el terminal carboxi de su cadena pesada (véase, p. ej., la Solicitud de Patente de Estados Unidos publicada N^o US2015/0024411). En algunas realizaciones, un tampón de lavado de un depósito de tampón de lavado **6**, tal como solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene albúmina de suero bovino al 0,5%, albúmina de suero humano o albúmina de suero humano recombinante, se carga para correr a través de la primera columna de selección por tubo acoplado de manera operativa. El flujo directo se dirige al contenedor de residuos **10** a través de válvulas **13** que conectan operativamente la primera columna de selección y el contenedor de residuos. En algunas realizaciones, la etapa de lavado se repite una pluralidad de veces.

[0328] Un depósito que contiene un fragmento Fab anti-CD4 **19** se carga para correr a través de la bomba **8**, el tubo y las válvulas **13** de modo que el Fab anti-CD4 se aplica a la segunda columna de selección **2**, por lo que el Fab anti-CD8 se convierte en inmovilizado en Strep-Tactin® en la matriz de afinidad **4** con un Twin Strep-Tag®. En algunas realizaciones, un tampón de lavado desde un depósito de tampón de lavado **6** se pasa a través de la segunda columna de selección a través de tubos acoplados operativamente. El flujo directo se dirige al contenedor de residuos **10** a través de válvulas **13** que conectan operativamente la segunda columna de selección y el contenedor de residuos. En algunas realizaciones, la etapa de lavado se repite una pluralidad de veces.

[0329] El volumen de reactivo de matriz de afinidad contenido en la primera columna de selección y la segunda columna de la selección puede ser el mismo o diferente, y puede seleccionarse basándose en el rendimiento deseado de la selección y/o la proporción deseada de células CD4⁺ para las células CD8⁺ después de la selección. El volumen así elegido se basa en la suposición de un rendimiento promedio de 1 X 10⁸ células que pueden seleccionarse por cada volumen de 1 µL de columna llena. En un proceso ejemplar, los volúmenes de columna son los mismos, p. ej., usando un volumen de 2 µL para la columna para el fragmento Fab anti-CD8 y una columna de 2 µL para el fragmento Fab anti-CD4. La longitud de la columna y/o el diámetro de la columna se pueden elegir para ajustarse al volumen deseado, p. ej., para lograr una relación deseada de iniciación del cultivo de células CD4⁺ a células CD8⁺. En algunas realizaciones, para acomodar el volumen de la matriz de afinidad, una pluralidad de columnas que se han inmovilizado a la misma, el mismo reactivo Fab puede agregarse directamente en serie y conectarse operativamente entre sí a través de una línea de tubos.

[0330] Para lograr la selección de células, se aplica una muestra de aféresis a la primera columna de selección **1**, por lo que las células T CD8⁺, si están presentes en la muestra, permanecen unidas a la resina **3** de la primera columna, como células no seleccionadas (que contienen células CD8) pasan a través de la columna. El número de células en la muestra inicial utilizada en algunos ejemplos se elige por encima del número de células que se seleccionarán en función del volumen combinado de las matrices, como una cantidad mayor que la capacidad de la columna para cada selección (p. ej., un cantidad que tiene más de 200 millones de células CD8⁺ y mayor que 200 millones de células CD4⁺, p. ej., mayor en al menos aproximadamente 10% o 20% o mayor). El flujo que contiene células no seleccionadas (fracción negativa) luego pasa de la primera columna a una segunda columna de selección **2** a través de tubos acoplados operativamente. Las células T CD4⁺ permanecen unidas a la resina **4** en la segunda columna. El flujo a través del fluido que contiene y otras células no seleccionadas (células negativas) se dirige a un contenedor de residuos **10** a través de válvulas **13** que conectan operativamente la segunda columna de selección y el contenedor de residuos.

[0331] En algunas realizaciones, la primera columna de selección puede ser alternativamente una matriz de cromatografía de afinidad anti-CD4 y la segunda columna de selección puede ser una matriz de cromatografía de afinidad anti-CD8.

[0332] Desde un depósito de tampón de lavado **6**, se pasa un tampón de lavado a través de la primera columna y la segunda columna a través de tubos acoplados operativamente. El flujo que contiene las células que se lavan de la primera y segunda columnas se dirige al contenedor de residuos **10** a través de válvulas **13** que conectan operativamente la segunda columna de selección y el contenedor de residuos. En algunas realizaciones, la etapa de lavado se repite una pluralidad de veces.

[0333] Desde un depósito de tampón de elución **7**, se carga un tampón que contiene un eluyente, tal como bajas concentraciones de biotina o un análogo de la misma, p. ej., destiobiotina 2,5 mM, para pasar a través de la primera columna y la segunda columna a través de tubos acoplados operativamente. En algunas realizaciones, el eluyente contiene medios de cultivo celular. El flujo continuo, que contiene células CD4⁺ y CD8⁺ enriquecidas y biotina residual o análogo, se dirige a una cámara de retirada **9** para eliminar biotina o un análogo de la misma. La cámara de extracción **9** es una columna de perlas Superflow™ sepharose® que tienen Strep-Tactin® inmovilizada con un volumen suficiente para eliminar biotina o un análogo de biotina de la muestra, tal como una columna que tiene un volumen de lecho de 6 µL con una capacidad de unión de 300 nanomol de biotina/ml. El flujo a través de células enriquecidas positivamente seleccionadas para CD4⁺ y CD8⁺ se dirige a un recipiente de cultivo **12**, tal como una bolsa, a través de válvulas que conectan operativamente la cámara de retirada **9** y el recipiente de cultivo. En algunas realizaciones, la etapa de elución se repite.

[0334] En algunas realizaciones, después de realizar la etapa de elución, un tampón de activación que contiene un reactivo de activación de células T (p. ej., anti-CD3, anti-CD28, IL-2, IL-15, IL-7 y/o IL-21) reemplaza el tampón de lavado y se dirige a través de la cámara de extracción y fluye a través del recipiente de cultivo. La fracción positiva recogida en el recipiente de cultivo es una población de células CD4⁺ y CD8⁺ aisladas y combinadas.

B. Enriquecimiento para una población de células T CD4⁺ y una población de células T CD8⁺, enriquecida para células que expresan un marcador en células de memoria central T (T_{CM})

[0335] En el proceso ejemplar, representado en la figura 1B, una serie de columnas de selección inmunocromatográfica y las columnas de extracción están dispuestas en un aparato cerrado **14** conectado operativamente entre sí y una bomba peristáltica **8** a través de varias tuberías y válvulas **13** para controlar el flujo de la fase líquida.

[0336] La primera columna de selección **1** y la segunda columna de selección **2** son las mismas que las descritas anteriormente con respecto al Ejemplo 2A. Además, el proceso incluye además una tercera columna de selección **15** que contiene un volumen elegido de una matriz de afinidad **17**, tal como una resina de agarosa, tal como una resina como se describe en la Solicitud de Patente de EE.UU. publicada. N° US2015/0024411 para el aislamiento de células T, tal como una como se describió anteriormente en el Ejemplo 2A.

[0337] El Fab anti-CD8 y el Fab anti-CD4 se aplican a la primera columna y la segunda columna, respectivamente, como se describe en el Ejemplo 2A. Un depósito que contiene un fragmento Fab adicional contra un marcador expresado en las células T (T_{CM}) **20** de la memoria central, como una de CD28, CD62L, CCR7, CD27 o CD127, se carga para pasar por la bomba **8**, el tubo y las válvulas **13** de tal manera que el más Fab se aplica a la columna de la tercera selección **15**, por lo que el más Fab se convierte con el Strep-Tactin® en la matriz de afinidad **17** con un doble Strep-Tag® (SEQ ID NO:10; IBA GmbH) en el Fragmento Fab, que se fusiona con el terminal carboxi de su cadena pesada, como se describe en el Ejemplo 2A. En algunas realizaciones, un tampón de lavado, como se describe en el Ejemplo 2A, se carga para correr a través de la tercera columna de selección a través de tubos acoplados operativamente. El flujo directo se dirige al contenedor de residuos **10** a través de válvulas **13** que conectan operativamente la tercera columna de selección y el contenedor de residuos. En algunas realizaciones, la etapa de lavado se repite una pluralidad de veces.

[0338] El volumen de reactivo de matriz de afinidad contenido en la primera selección, segunda y/o tercera columnas de selección puede ser el mismo o diferente, y puede elegirse en función del rendimiento deseado de la selección y/o la relación deseada de células CD4⁺ a células CD8⁺ enriquecidas para células que expresan un marcador expresado en células T (T_{CM}) de memoria central después de la selección. El volumen así elegido se basa en la suposición de un rendimiento promedio de 1 X 10⁸ células que pueden seleccionarse por cada volumen de 1 µL de columna llena. Además, para una relación de inicio de cultivo elegida particular, p. ej., una relación de inicio de cultivo de 1:1 de células CD4⁺ a una población que contiene células CD8⁺ enriquecidas para un marcador expresado en células T (T_{CM}) de memoria central (p. ej., una población de células CD8⁺ enriquecidas en base a una selección adicional para una de CD28, CD62L, CCR7, CD27 o CD127), el volumen de la matriz para seleccionar la población madre de la población enriquecida, p. ej., las células CD8⁺, es mayor en comparación con la matriz utilizada para seleccionar la otra población de células T CD4⁺ o CD8⁺, p. ej., la población CD4⁺. La cantidad o extensión en donde el volumen de la matriz utilizada para seleccionar la población parental de la población enriquecida adicional, p. ej., la matriz que contiene el fragmento Fab anti-CD8, es mayor que el volumen de la otra matriz u otras matrices se elige en función de la fracción o porcentaje de la población más enriquecida de células en la muestra (p. ej., CD8⁺/CD28⁺, CD8⁺/CD62L⁺, CD8⁺/CCR7⁺, CD8⁺/CD127⁺ o CD8⁺/CD27⁺) en comparación con la fracción o porcentaje de la población de padres, p. ej., células CD8⁺, presente en la muestra. Esto se puede estimar en función de los promedios entre pacientes o donantes sanos, o se puede medir para un paciente determinado en donde se realiza la selección antes de determinar el tamaño de las columnas a utilizar.

[0339] En un proceso ejemplar, los volúmenes de columna utilizados en el proceso son, p. ej., una columna de 2 µL con fragmentos Fab anti-CD4, una columna de 6 µL con fragmentos Fab anti-CD8 y una columna de 2 µL con fragmentos Fab anti-CD62L. La longitud de la columna y/o el diámetro de la columna se pueden elegir para ajustarse al volumen deseado, p. ej., para lograr una relación deseada de iniciación del cultivo de células CD4⁺ a células CD8⁺

enriquecidas para células que expresan un marcador expresado en células T (T_{CM}) de memoria central, p. ej., células $CD8^+/CD28^+$, $CD8^+/CD62L^+$, $CD8^+/CCR7^+$, $CD8^+/CD27^+$ o $CD8^+/CD127^+$. En algunas realizaciones, para acomodar el volumen de la matriz de afinidad, se puede agregar una serie de columnas inmovilizadas a la misma Fab directamente en serie y conectarse operativamente entre sí a través de una línea de tubería.

5 **[0340]** Para lograr la selección de células, se aplica una muestra de aféresis a la primera columna de selección 1, por lo que las células T $CD8^+$, si están presentes en la muestra, permanecen unidas a la resina de la primera columna como células no seleccionadas (que contienen células $CD8$) pasan por la columna. El número de células en la muestra inicial utilizada en algunos ejemplos se elige por encima del número de células que se seleccionarán en función del volumen combinado de las matrices, como una cantidad mayor que la capacidad de la columna para cada selección (p. ej., una cantidad que tiene más de 200 millones de células $CD8^+/CD62L^+$ y más de 200 millones de células $CD4^+$, p. ej., mayor en al menos aproximadamente 10% o 20% o más). El flujo que contiene células no seleccionadas (fracción negativa) se dirige a pasar a la segunda columna 2 a través de una válvula 13 que conecta operativamente la primera y segunda columna. Las células T $CD4^+$ permanecen unidas a la resina en la segunda columna. El fluido que contiene el flujo y otras células no seleccionadas (células negativas) se dirigen a un primer contenedor de residuos 10 a través de válvulas 13 que conectan operativamente la segunda columna de selección y el contenedor de fracción negativa.

20 **[0341]** Desde un depósito de tampón de lavado 6, un tampón de lavado, tal como se describe en el Ejemplo 2A, se carga a ejecutar a través de la primera columna y la segunda columna a través de una válvula y tubos conectando de manera operativa las columnas. El flujo que contiene las células que se lavan de la primera y segunda columnas se dirige al contenedor de residuos 10 a través de válvulas 13 que conectan operativamente la segunda columna de selección y el contenedor de residuos. En algunas realizaciones, la etapa de lavado se repite una pluralidad de veces.

25 **[0342]** Desde un depósito de tampón de de elución 7, se carga un tampón que contiene un eluyente, tal como biotina o un análogo del mismo, p. ej., destiobiotina 2,5 mM, para correr a través de la segunda columna 2 a través de las válvulas 13 y tubos que conectan operativamente el depósito de tampón de de elución y segunda columna. En algunas realizaciones, el tampón de de elución contiene medios de cultivo celular. El flujo continuo, que contiene células $CD4^+$ enriquecidas y biotina residual, se dirige a una cámara de retirada 9 para eliminar la biotina, tal como se describe en el Ejemplo 2A, que está operativamente conectado a la segunda columna a través de una válvula 13 y un tubo. El flujo que contiene células enriquecidas seleccionadas positivamente para $CD4^+$ se dirige a un recipiente de cultivo 12, tal como una bolsa, a través de válvulas 13 que conectan operativamente la cámara de extracción 9 y el recipiente de cultivo. En algunas realizaciones, la etapa de elución se repite. En algunas realizaciones, después de realizar la etapa de elución, un tampón de activación que contiene un reactivo de activación de células T (p. ej., anti- $CD3$, anti- $CD28$, IL-2, IL-15, IL-7 y/o IL-21) reemplaza el tampón de lavado y se dirige a través de válvulas y tubos desde el depósito del tampón de lavado a la segunda columna, la cámara de extracción y dentro del recipiente de cultivo. La fracción positiva recogida en el recipiente de cultivo es una población de células $CD4^+$ aisladas.

30 **[0343]** Desde un depósito de tampón de de elución 7, se carga un tampón que contiene un eluyente, tal como biotina, para correr a través de la primera columna 1 a través de una válvula 13 y un tubo que conecta operativamente el depósito de tampón de elución y la primera columna. En algunas realizaciones, el tampón de elución contiene medios de cultivo celular. El flujo continuo, que contiene células $CD8^+$ enriquecidas y biotina residual o un análogo de la misma, se dirige a una cámara de retirada 9 para eliminar biotina o un análogo de biotina, como se describe en el Ejemplo 2A, que está operativamente conectado a la primera columna a través de una válvula 13 y tubos. Las células enriquecidas que contienen el flujo seleccionado positivamente para $CD8^+$ se dirigen a pasar a una tercera columna 15 a través de una válvula 13 que conecta operativamente la cámara de extracción 9 y la tercera columna. Un subconjunto $CD62L^+$ de las células $CD8^+$ permanece unido a la resina en la tercera columna. El flujo a través del fluido que contiene y otras células no seleccionadas (células negativas) se dirige a un segundo contenedor de residuos 11 a través de válvulas 13 que conectan operativamente la tercera columna de selección y el segundo contenedor de residuos.

35 **[0344]** Desde un depósito de tampón de lavado 6, un tampón de lavado, tal como se describe en el Ejemplo 2A, se carga a ejecutar a través de la tercera columna 15 a través de válvulas 13 y la tubería de conexión de manera operativa el depósito de tampón de lavado y tercera columna. El flujo que contiene las células que se lavan de la tercera columna se dirige al segundo contenedor de residuos 11 a través de válvulas 13 que conectan operativamente la tercera columna de selección y el segundo contenedor de residuos. En algunas realizaciones, la etapa de lavado se repite una pluralidad de veces.

40 **[0345]** Desde un depósito de tampón de de elución 7, se carga un tampón que contiene un eluyente, tal como biotina o un análogo del mismo, p. ej., destiobiotina 2,5 mM, para correr a través de la tercera columna 15 a través de una válvula 13 y un tubo que conecta operativamente el tampón de de elución embalse y tercera columna. En algunas realizaciones, el tampón de de elución contiene medios de cultivo celular. El flujo que contiene las células $CD8^+$ enriquecidas para las células T (T_{CM}) de memoria central que expresan una de $CD28$, $CD62L$, $CCR7$, $CD27$ o $CD 127$, y la biotina residual o análogo de la misma, se dirige a una cámara de extracción 9 para eliminar la biotina o una biotina análoga, tal como se describe en el Ejemplo 2A, que está operativamente conectada a la tercera columna a través de una válvula 13 y un tubo. El flujo que contiene células de memoria de células T enriquecidas seleccionadas positivamente para $CD8$ y un marcador expresado en células de memoria central T (T_{CM}), como una de $CD28$, $CD62L$,

CCR7, CD27 o CD127, se dirige al recipiente de cultivo **12**, como una bolsa, a través de válvulas **13** que conectan operativamente la cámara de extracción 9 y el recipiente de cultivo. En algunas realizaciones, el recipiente de cultivo contiene un reactivo de activación de células T, un medio de cultivo celular o ambos. En algunas realizaciones, la etapa de elución se repite. En algunas realizaciones, después de realizar la etapa de elución, un tampón de activación que contiene un reactivo de activación de células T (p. ej., anti-CD3, anti-CD28, IL-2, IL-15, IL-7 y/o IL-21) reemplaza el tampón de lavado y se dirige a través de válvulas y tubos de depósito de tampón de lavado a la primera y/o tercera columna, la cámara de extracción y en el recipiente de cultivo. La fracción positiva que contiene células CD8⁺ y células positivas para un marcador en las células T (T_{CM}) de memoria central, como una de CD28, CD62L, CCR7, CD27 o CD127, se recoge en el recipiente de cultivo con la fracción positiva CD4⁺ previamente recogida. En algunas realizaciones, los pasos del proceso se pueden realizar en un orden diferente, como enriquecer primero las células que contienen células CD8⁺ y las células positivas para un marcador en las células T (T_{CM}) de memoria central, como una de CD28, CD62L, CCR7, CD27 o CD127 antes de enriquecer las células CD4⁺.

Ejemplo 3: Generación de una composición de células T CD4⁺ y CD8⁺ mediante purificación secuencial en un sistema cerrado para uso en ingeniería genética y terapia celular adoptiva

[0346] Este ejemplo demuestra un procedimiento para seleccionar y generar una composición de células que contienen células T CD4⁺ y CD8⁺, como las células T CD4⁺ y CD8⁺ presentes en una relación de iniciación de cultivo, para incubación/activación y transducción en métodos asociados con la ingeniería genética de las células para su uso en relación con la terapia celular adoptiva.

[0347] Una composición de células generadas por selección de células CD4⁺ y CD8⁺, realizada como se describe en el Ejemplo 2A (CD4⁺ y CD8⁺) o el Ejemplo 2B (CD4⁺ y CD8⁺ enriquecido para CD62L⁺), se incuba en condiciones estimulantes, tales como el uso de anti-CD3/anti-CD28 en presencia de IL-2(100 UI/ml), p. ej., durante 72 horas a 37°C. Luego, las células estimuladas se modifican genéticamente mediante la introducción en las células de genes recombinantes para la expresión de receptores de antígeno recombinante, como los receptores de antígeno quimérico (CAR) o los TCR recombinantes, p. ej., por transducción viral. En algunas realizaciones, después de la introducción, las células se incuban adicionalmente, generalmente a 37 grados C, p. ej., para permitir la expansión celular.

[0348] El método da como resultado una composición de salida con células T CD4⁺ y CD8⁺ diseñadas. En algunas formas de realización, basado en el volumen elegido de las columnas de selección, la proporción de CD4⁺ a las células CD8⁺ en la composición que se incuba bajo las condiciones de estimulación antes de ingeniería (relación de iniciación de cultivo) resulta en una relación de salida deseada particular de células CD4⁺ a CD8⁺ o de células CD4⁺ modificadas a células CD8⁺ modificadas, o una relación que esté dentro de un cierto rango de error tolerado de dicha proporción de salida deseada, siguiendo los pasos de incubación, estimulación y/o ingeniería. En algunas realizaciones, tal relación de salida deseada o relación dentro del rango de error tolerado se logra un cierto porcentaje tolerado del tiempo.

Ejemplo 4: Selección de células usando concentraciones de rendimiento subóptimas de superficies recubiertas de Fab

[0349] Se incubaron muestras de PBPC derivadas de aféresis humana, en un rango de diferentes números de células, en una composición única con microperlas magnéticas conjugadas con Fabs anti-CD4 y microperlas magnéticas conjugadas con Fabs anti-CD8, con mezcla suave durante aproximadamente 30 minutos. A esta incubación le siguió la elución de células no seleccionadas, y la recuperación usando un campo magnético se llevó a cabo como se describió anteriormente. La incubación usando entre 0,05 y 1,5 µL de cada reactivo de microesferas por millón de células produjo bajos rendimientos de células CD4⁺ o CD8⁺, respectivamente (células recuperadas para la selección respectiva en comparación con las células positivas en la incubación), que en este estudio generalmente estuvieron en el rango del 15-70%). En promedio, se observaron mayores rendimientos a concentraciones más altas de reactivos por célula usando tales concentraciones de rendimiento subóptimas.

[0350] En consecuencia, en un ejemplo, se lleva a cabo una selección, en donde las PBMC se incuban con concentraciones subóptimas por número celular de perlas acopladas a un enlace de CD4 y perlas acopladas a un agente de unión a CD8, y las células se recuperan usando un campo magnético. En función de la relación observada entre la concentración del reactivo por célula y el rendimiento de las perlas utilizadas, uno u otro del reactivo de unión a CD4 o CD8 se incluye a una concentración más alta (p. ej., un mayor número de moléculas de unión a Cd4 o CD8 incluido por célula), produciendo así una relación de salida de células CD8⁺: CD4⁺ después de la selección, que es mayor o menor que 1, como 1,5:1 o 2:1 o 3:1 o 1:1,5, 1:2, o 1:3. La relación de salida puede seleccionarse en función de la relación deseada de células CD8 frente a CD4 en una composición que contiene células modificadas para producirse siguiendo uno o más pasos adicionales, tales como activación, transducción y/o expansión.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0351]

<110> Juno Therapeutics, Inc. RAMSBORG, Chris BONYHADI, Mark CHEN, Calvin BEAUCHESNE, Pascal

ES 2 759 260 T3

<120> MÉTODOS PARA AISLAR, CULTIVAR Y MODIFICAR GENÉTICAMENTE POBLACIONES DE CÉLULAS INMUNITARIAS PARA TERAPIA ADOPTIVA

5 <130> 735042000240

<140> Aún no asignado
<141> Concurrentemente aquí

10 <150> US 61/983,415
<151> 2014-04-23

<160> 19

15 <170> FastSEQ para Windows Versión 4,0

<210> 1
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> Sintético

25 <220>
<223> Péptido de unión a estreptavidina

<220>
<221> VARIANTE
<222> 3
<223> Xaa se selecciona de glutamina, asparagina y metionina

30

<400> 1

35 **His Pro Xaa**
1

<210> 2
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40

<220>
<223> Sintético

45

<220>
<223> Péptido de unión a estreptavidina

<400> 2

50

His Pro Gln Phe
1

<210> 3
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55

<220>
<223> Sintético

60

<220>
<223> Péptido de unión a estreptavidina

65

ES 2 759 260 T3

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1
 <223> Xaa = Trp, Lys o Arg
 5

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 2
 <223> Xaa = cualquier aminoácido
 10

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 7
 <223> Xaa = Gly o Glu
 15

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 8
 <223> Xaa = Gly, Lys o Arg
 20

<400> 3
 Xaa Xaa His Pro Gln Phe Xaa Xaa
 25
 1 5

<210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30

<220>
 <223> Sintético
 35

<220>
 <223> Péptido de unión a estreptavidina
 40

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 2
 <223> Xaa = cualquier aminoácido
 45

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 7
 <223> Xaa = Gly o Glu
 50

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 8
 <223> Xaa = Gly, Lys o Arg
 55

<400> 4
 Trp Xaa His Pro Gln Phe Xaa Xaa
 1 5

<210> 5
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 60

<220>
 <223> Sintético
 65

ES 2 759 260 T3

<220>
 <223> Péptido de unión a estreptavidina

<400> 5

5

Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly
 1 5

10

<210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Sintético

20

<220>
 <223> Strep-tag (marca registrada) II

<400> 6

25

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 1 5

30

<210> 7
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Sintético

40

<220>
 <223> Módulos secuenciales de péptido de unión a estreptavidina

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (9). (20)
 <223> Xaa en las posiciones 9-20 puede ser cualquier aminoácido y 4 de ellos pueden estar ausentes

45

<400> 7

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 20 25

50

<210> 8
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> Sintético

60

<220>
 <223> Módulos secuenciales de péptido de unión a estreptavidina

65

<220>

ES 2 759 260 T3

<221> VARIANTE
 <222> (9). (12)
 <223> Estos aminoácidos pueden estar ausentes

5 <400> 8

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 10 Gly Gly Gly Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 20 25

15 <210> 9
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<220>
 <223> Etiqueta de estreptococo gemelo

25 <400> 9

Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 1 5 10 15
 30 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 20 25 30

35 <210> 10
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sintético

<220>
 <223> Etiqueta Strep gemela

45 <400> 10

Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 1 5 10 15
 50 Gly Ser Gly Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 20 25 30

55 <210> 11
 <211> 159
 <212> PRT
 <213> Streptomyces Avidinii

60 <220>
 <223> Streptavidin

<400> 11

65

ES 2 759 260 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55

Asp	Pro	Ser	Lys	Asp	Ser	Lys	Ala	Gln	Val	Ser	Ala	Ala	Glu	Ala	Gly
1				5					10					15	
Ile	Thr	Gly	Thr	Trp	Tyr	Asn	Gln	Leu	Gly	Ser	Thr	Phe	Ile	Val	Thr
			20					25					30		
Ala	Gly	Ala	Asp	Gly	Ala	Leu	Thr	Gly	Thr	Tyr	Glu	Ser	Ala	Val	Gly
		35					40					45			
Asn	Ala	Glu	Ser	Arg	Tyr	Val	Leu	Thr	Gly	Arg	Tyr	Asp	Ser	Ala	Pro
	50					55				60					
Ala	Thr	Asp	Gly	Ser	Gly	Thr	Ala	Leu	Gly	Trp	Thr	Val	Ala	Trp	Lys
65					70					75					80
Asn	Asn	Tyr	Arg	Asn	Ala	His	Ser	Ala	Thr	Thr	Trp	Ser	Gly	Gln	Tyr
				85					90					95	
Val	Gly	Gly	Ala	Glu	Ala	Arg	Ile	Asn	Thr	Gln	Trp	Leu	Leu	Thr	Ser
			100					105					110		
Gly	Thr	Thr	Glu	Ala	Asn	Ala	Trp	Lys	Ser	Thr	Leu	Val	Gly	His	Asp
		115					120					125			
Thr	Phe	Thr	Lys	Val	Lys	Pro	Ser	Ala	Ala	Ser	Ile	Asp	Ala	Ala	Lys
	130					135					140				
Lys	Ala	Gly	Val	Asn	Asn	Gly	Asn	Pro	Leu	Asp	Ala	Val	Gln	Gln	
145					150					155					

<210> 12
 <211> 159
 <212> PRT
 <213> Streptomyces Avidinii

<220>
 <223> Estreptavidina muteína Val44-Thr45-Ala46-Arg47

<400> 12

35
 40
 45
 50
 55

Asp	Pro	Ser	Lys	Asp	Ser	Lys	Ala	Gln	Val	Ser	Ala	Ala	Glu	Ala	Gly
1				5					10					15	
Ile	Thr	Gly	Thr	Trp	Tyr	Asn	Gln	Leu	Gly	Ser	Thr	Phe	Ile	Val	Thr
			20					25					30		
Ala	Gly	Ala	Asp	Gly	Ala	Leu	Thr	Gly	Thr	Tyr	Val	Thr	Ala	Arg	Gly
		35					40					45			
Asn	Ala	Glu	Ser	Arg	Tyr	Val	Leu	Thr	Gly	Arg	Tyr	Asp	Ser	Ala	Pro
	50					55				60					
Ala	Thr	Asp	Gly	Ser	Gly	Thr	Ala	Leu	Gly	Trp	Thr	Val	Ala	Trp	Lys
65					70					75					80
Asn	Asn	Tyr	Arg	Asn	Ala	His	Ser	Ala	Thr	Thr	Trp	Ser	Gly	Gln	Tyr
				85					90					95	
Val	Gly	Gly	Ala	Glu	Ala	Arg	Ile	Asn	Thr	Gln	Trp	Leu	Leu	Thr	Ser
			100					105					110		
Gly	Thr	Thr	Glu	Ala	Asn	Ala	Trp	Lys	Ser	Thr	Leu	Val	Gly	His	Asp
		115					120					125			
Thr	Phe	Thr	Lys	Val	Lys	Pro	Ser	Ala	Ala	Ser	Ile	Asp	Ala	Ala	Lys
	130					135					140				
Lys	Ala	Gly	Val	Asn	Asn	Gly	Asn	Pro	Leu	Asp	Ala	Val	Gln	Gln	
145					150					155					

<210> 13
 <211> 159
 <212> PRT
 <213> Streptomyces Avidinii

<220>
 <223> Muteína estreptavidina Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47

ES 2 759 260 T3

<400> 13

5 Asp Pro Ser Lys Asp Ser Lys Ala Gln Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly
 1 5 10 15
 Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr
 20 25 30
 Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ile Gly Ala Arg Gly
 35 40 45
 10 Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Ala Pro
 50 55 60
 Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys
 65 70 75 80
 15 Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr
 85 90 95
 Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser
 100 105 110
 Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val Gly His Asp
 115 120 125
 20 Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser Ile Asp Ala Ala Lys
 130 135 140
 Lys Ala Gly Val Asn Asn Gly Asn Pro Leu Asp Ala Val Gln Gln
 145 150 155

25

<210> 14
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Streptomyces Avidinii

30

<220>
 <223> Estreptavidina mínima

<400> 14

35

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe
 1 5 10 15
 Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Glu Ser
 20 25 30
 40 Ala Val Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp
 35 40 45
 Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val
 50 55 60
 45 Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser
 65 70 75 80
 Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu
 85 90 95
 50 Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val
 100 105 110
 Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser
 115 120 125

55

<210> 15
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Streptomyces Avidinii

60

<220>
 <223> Estreptavidina muteína Val44-Thr45-Ala46-Arg47

<400> 15

65

ES 2 759 260 T3

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe
 1 5 10 15
 5 Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr
 20 25 30
 Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp
 35 40 45
 10 Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val
 50 55 60
 Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser
 65 70 75 80
 Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu
 85 90 95
 15 Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val
 100 105 110
 Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser
 115 120 125
 20

<210> 16
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Streptomyces avidinii

<220>
 <223> Muteína estreptavidina Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47
 <400> 16

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe
 1 5 10 15
 35 Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ile Gly
 20 25 30
 Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp
 35 40 45
 40 Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val
 50 55 60
 Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser
 65 70 75 80
 Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu
 85 90 95
 45 Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val
 100 105 110
 Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser
 115 120 125

<210> 17
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<220>
 <223> Etiqueta Strep gemela

<400> 17

65

ES 2 759 260 T3

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 20 25

10 <210> 18
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Sintético
 <220>
 <223> Etiqueta Strep gemela

<400> 18 20
 Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 20 25

30 <210> 19
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético
 35 <220>
 <223> Etiqueta de Strep gemela

<400> 19
 40 Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 Gly Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 45 20 25

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para enriquecer las células T CD4⁺ y CD8⁺, el método comprende:

- 5 (a) realizar una primera selección en un sistema cerrado, dicha primera selección comprende el enriquecimiento para una de (I) células CD4⁺ y (II) células CD8⁺ de una muestra que contiene células T humanas primarias, generando el enriquecimiento así una primera población seleccionada y una población no seleccionada; y
- 10 (b) realizar una segunda selección en el sistema cerrado, comprendiendo dicha segunda selección enriquecer para la otra de (I) células CD4⁺ y (II) células CD8⁺ de la población no seleccionada, generando así el enriquecimiento de una segunda población seleccionada.

2. El método de la reivindicación 1, que comprende además:

- 15 incubar células de la primera población seleccionada en condiciones estimulantes e incubar células de la segunda población seleccionada en condiciones estimulantes; y/o introducir un receptor de antígeno genéticamente modificado en células de la primera población seleccionada y en células de la segunda población seleccionada.

20 3. El método de la reivindicación 1, que comprende además:

- incubar una composición iniciadora de cultivo que comprende células de la primera población seleccionada y células de la segunda población seleccionada, opcionalmente en una proporción deseada, en un recipiente de cultivo en condiciones estimulantes, generando así células estimuladas; y
- 25 opcionalmente introducir un receptor de antígeno genéticamente modificado en una pluralidad de células estimuladas, en donde el método genera una composición de salida que comprende células T CD4⁺ y células T CD8⁺ que expresan el receptor de antígeno genéticamente modificado.

30 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende además la combinación de células de la primera población seleccionada y las células de la segunda población seleccionada en una proporción deseada de células CD4⁺ a las células CD8⁺.

35 5. El método de la reivindicación 4, en donde dicha relación deseada es entre aproximadamente 2:1 y aproximadamente 1:5, aproximadamente 2:1 y aproximadamente 1:2, aproximadamente 1,5:1 y aproximadamente o aproximadamente 1:5, aproximadamente 1,5:1 y aproximadamente 1:2, o aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:2, o es o es aproximadamente 1,1.

6. El método de la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en donde dicha relación deseada es de aproximadamente 1:1.

40 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en donde dicha combinación se realiza en el sistema cerrado.

8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 4-7, en donde el método genera así una composición de salida que comprende las células T CD4⁺ y CD8⁺ en la proporción deseada.

45 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde las células enriquecedoras en la primera y/o segunda selección comprenden una selección basada en inmunofinidad.

50 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la primera selección y la segunda selección se llevan a cabo en recipientes de separación separados, que están conectados operativamente.

11. El método de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en donde la selección basada en inmunofinidad en la primera y/o segunda selección comprende:

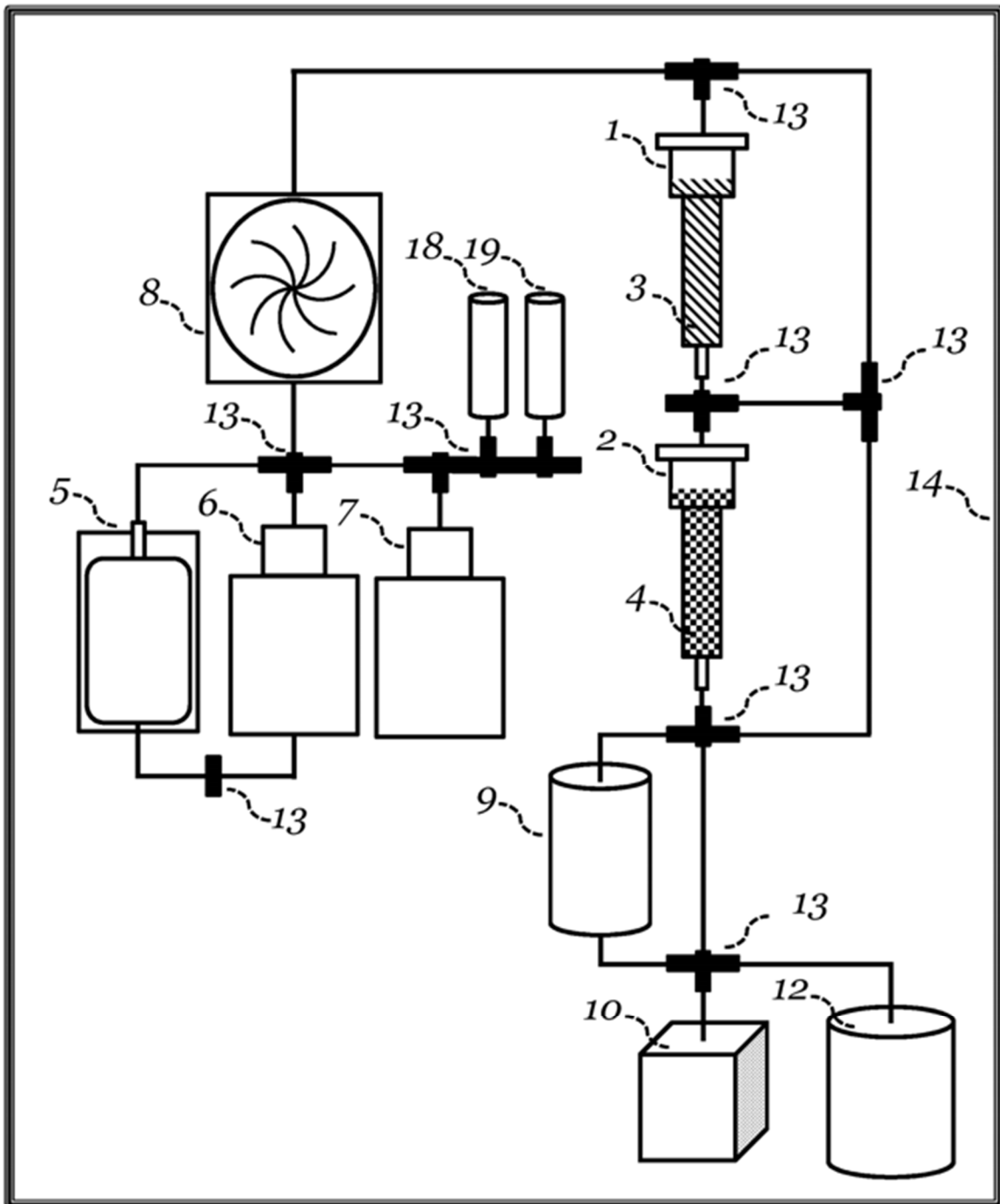
- 55 poner en contacto las células con un anticuerpo inmovilizado o unido a una matriz de cromatografía de afinidad, dicho anticuerpo capaz de unirse específicamente a un marcador de superficie celular para efectuar una selección positiva o negativa de células CD4⁺ o CD8⁺; y recolectar células de la matriz de cromatografía de afinidad enriquecida para las células CD4⁺ o las células CD8⁺.

60 12. El método de la reivindicación 11, en donde:

- el anticuerpo comprende uno o más pares de unión capaces de formar un enlace reversible con un reactivo de unión inmovilizado en la matriz de cromatografía de afinidad, por lo que el anticuerpo se une reversiblemente a dicha matriz de cromatografía de afinidad durante dicho contacto; y las células que expresan un marcador de la superficie celular específicamente unido por el anticuerpo en dicha matriz de cromatografía de afinidad pueden recogerse de la matriz al interrumpir la unión reversible entre el reactivo de unión y el par de unión.
- 65

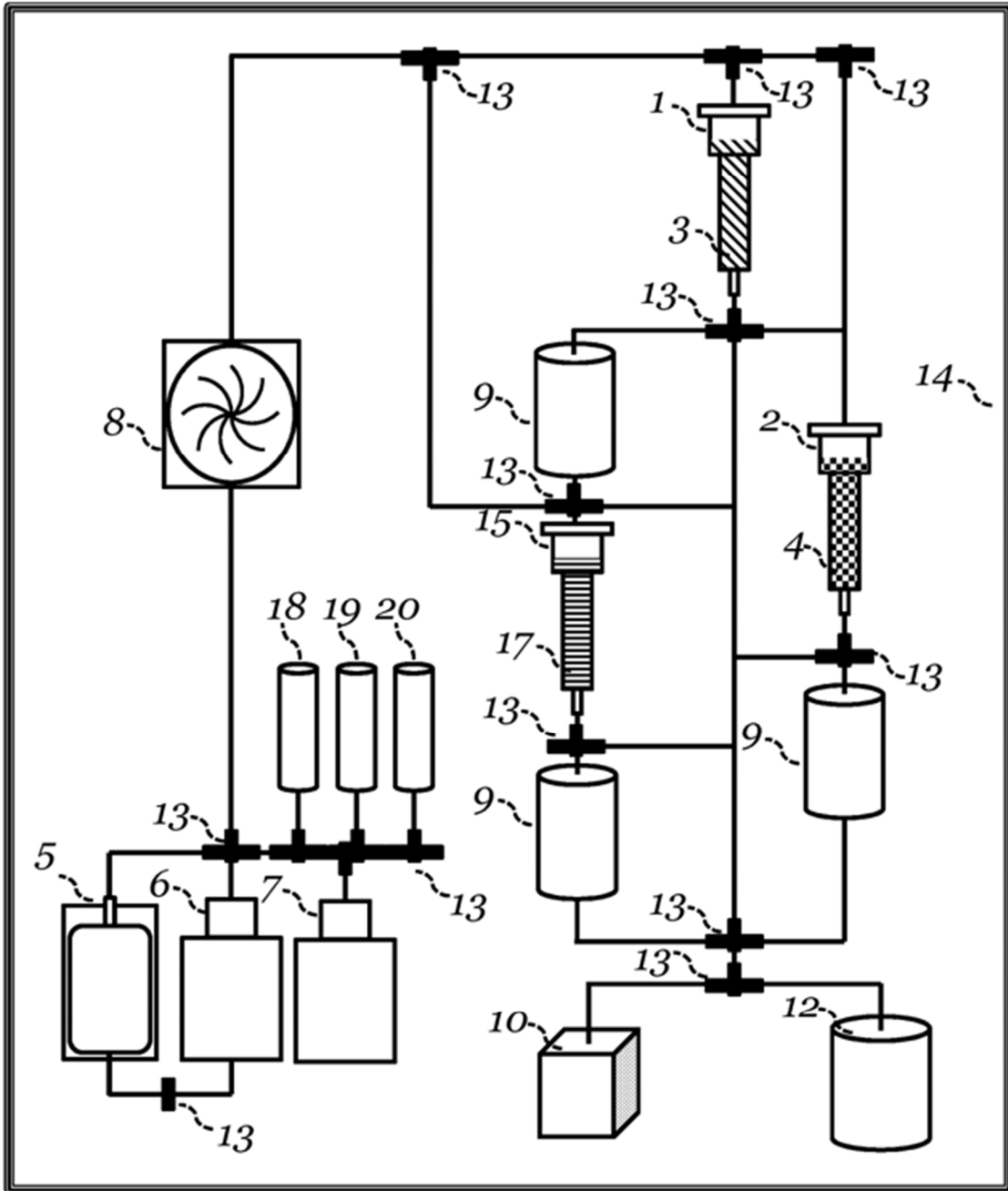
- 5 13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el enriquecimiento para las células CD4⁺ comprende una selección positiva basada en la expresión superficial de CD4 y/o el enriquecimiento para las células CD8⁺ comprende una selección positiva basada en la expresión superficial de CD8.
- 10 14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde una de la primera y segunda selecciones que comprende enriquecer para las células CD8⁺ comprende además enriquecer para células T (T_{CM}) de memoria central y/o enriquecer para células que expresan un marcador seleccionado de entre CD28, CD62L, CCR7, CD127 y CD27.
- 15 15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde la muestra se obtiene de un sujeto.
- 20 16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde la muestra es una muestra de sangre o derivada de sangre, una muestra de glóbulos blancos, una muestra de aféresis, una muestra de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o una muestra de leucoféresis.
- 25 17. El método de las reivindicaciones 2-16, en donde la condición estimulante:
comprende un agente capaz de activar uno o más dominios de señalización intracelular de uno o más componentes de un complejo TCR; y/o
comprende la presencia de un anticuerpo anti-CD3, un anticuerpo anti-CD28, un anticuerpo anti-4-1BB y/o una citocina.
- 30 18. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2-17, en donde:
el receptor de antígeno genéticamente modificado comprende un receptor de células T (TCR) o un receptor de antígeno funcional no TCR; o el receptor de antígeno genéticamente modificado comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR).
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

FIGURA 1A



Tubería ———

FIGURA 1B



Tubería ———