

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 800 906**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/12** (2015.01)  
**A61K 35/17** (2015.01)  
**A61K 38/17** (2006.01)  
**C12N 5/0783** (2010.01)  
**C12N 5/16** (2006.01)  
**C12N 7/00** (2006.01)  
**C12N 15/86** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.04.2015 PCT/US2015/027518**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **29.10.2015 WO15164745**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2015 E 15783117 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2020 EP 3134095**

54 Título: **Métodos mejorados para producir terapias celulares adoptivas**

30 Prioridad:

**25.04.2014 US 201461984558 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**05.01.2021**

73 Titular/es:

**BLUEBIRD BIO, INC. (100.0%)  
60 Binney Street  
Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**MORGAN, RICHARD;  
FRIEDMAN, KEVIN y  
MAIER, DAWN**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 800 906 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 mejorados para producir terapias celulares adoptivas

5 El listado de secuencias asociado con esta solicitud se proporciona en formato de texto en lugar de una copia en papel. El nombre del archivo de texto que contiene el Listado de secuencias es BLBD\_028\_01WO\_ST25.txt. El archivo de texto es de 3 KB, fue creado el 24 de abril de 2015 y se presenta electrónicamente a través de EFS-Web, junto con la presentación de la descripción.

10 Antecedentes

Campo técnico

15 La presente descripción se refiere a plataformas mejoradas y métodos asociados para producir células efectoras inmunitarias. Más particularmente, la descripción se refiere a métodos escalables, flexibles, confiables y reproducibles para producir composiciones de células efectoras inmunitarias terapéuticas que comprenden células t.

Descripción de la técnica relacionada

20 La inmunoterapia adoptiva o la terapia celular adoptiva (ACT) es la transferencia de linfocitos T modificados genéticamente a un sujeto para tratar una enfermedad. Aún debemos comprender que es posible emplear la inmunoterapia adoptiva para tratar una amplia variedad de enfermedades, que incluyen cáncer, enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias e inmunodeficiencia. Sin embargo, la mayoría, si no todas las estrategias de inmunoterapia adoptiva requieren etapas de activación y expansión de células  
25 T para generar una dosis terapéutica clínicamente efectiva de células T. Debido a la complejidad inherente del cultivo de células vivas y la variabilidad entre pacientes, las tecnologías actuales para generar dosis terapéuticas de células T, incluidas las células T modificadas, permanecen limitadas por los engorrosos procesos de producción de células T. Los procesos de producción de células T existentes no son fácilmente escalables, repetibles, confiables o eficientes y con frecuencia producen un producto de células T inferior que puede ser propenso al agotamiento y la pérdida de la  
30 función de las células inmunitarias efectoras.

Hasta la fecha, las inmunoterapias adoptivas de células T modificadas han tenido un éxito limitado y muestran una actividad clínica variable. Por lo tanto, tales terapias no son adecuadas para un uso clínico generalizado.

35 El documento WO 2013/126712 A1 enseña la transducción de células T CD4+ (un subconjunto de PBMC) con un lentivirus que codifica un CAR para activar las células T CAR para producir IL-2 endógena.

40 Adam y otros, analizan un protocolo para la generación y transducción de lentivirus en células T CD45RA+ humanas primarias (Adam y otros, "Simplified production and concentration of lentiviral vectors to achieve high transduction in primary human T cells"; BMC Biotechnology; 2013; 13:98).

45 El documento WO 2014/039523 A1 enseña la activación de células T mediante el uso de perlas recubiertas con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 durante 5 días y después la transfección de las células con polinucleótidos que codifican diferentes porciones de polipéptidos de receptores de antígeno quiméricos de múltiples cadenas.

El documento WO 2012/140130 A1 enseña un método para aumentar la proliferación y la supervivencia de linfocitos alogénicos alosensibilizados modificados genéticamente (ASAL).

50 Breve resumen

En un primer aspecto de la invención, se proporciona un método para producir un producto terapéutico de células T como se define en la reivindicación 1.

55 La descripción en general proporciona métodos para la terapia celular adoptiva.

Se proporciona un método para producir un producto terapéutico de células T que comprende: obtener una población de células que comprende células T y células presentadoras de antígeno (APC); cultivar la población de células en un medio de cultivo celular que comprende i) una o más citocinas, ii) un anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a CD3 de este, y iii) un anticuerpo anti-CD28 o un fragmento de unión a CD28 de este, B7-1 o un fragmento de unión a CD28 de este, o B7-2 o un fragmento de unión a CD28 de este, en donde el cultivo activa y estimula las células T; transducir la población de células activadas con un vector viral; y cultivar la población de células en un medio de cultivo celular para expandir las células T transducidas; para producir así el producto terapéutico de células T.

65 En ejemplos particulares, la población de células se obtiene de sangre periférica, células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de ganglios linfáticos, sangre de cordón umbilical, tejido de timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, derrame pleural, tejido del bazo o tumores.

## ES 2 800 906 T3

- 5 En ciertos ejemplos, las células T se obtienen de sangre periférica, células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de ganglios linfáticos, sangre de cordón umbilical, tejido de timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, derrame pleural, tejido del bazo, tumores o una línea de células T.
- En ejemplos adicionales, las APC se obtienen de sangre periférica, células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de ganglios linfáticos, sangre de cordón umbilical, tejido de timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, derrame pleural, tejido del bazo o tumores.
- 10 En las modalidades, la población de células comprende células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC).
- En modalidades adicionales, la cosecha u obtención de la población de células comprende leucocitaféresis.
- En modalidades particulares, aislar la población de células comprende sedimentación.
- 15 En modalidades adicionales, la sedimentación comprende un gradiente de FICOLL™ o PERCOLL™.
- En ciertas modalidades, la sedimentación se realiza mediante el uso de una centrífuga de flujo semiautomatizada.
- 20 En modalidades adicionales, la centrífuga de flujo semiautomatizada es un procesador de células Cobe 2991, un Cell Saver 5+ o un Teruma Elutra.
- En modalidades particulares, los métodos comprenden además lavar la población de células en un tampón o medio de cultivo celular.
- 25 En algunas modalidades, la población de células se lava en medio de cultivo de células T (TCGM) que contiene una o más citocinas.
- En algunas modalidades, la una o más citocinas en el TCGM se seleccionan del grupo que consiste en: IL-2, IL7, IL-15, IL-9 e IL-21.
- 30 En modalidades particulares, la citocina es IL-2.
- En ciertas modalidades, la concentración de IL-2 es de aproximadamente 250 UI/ml.
- 35 En ciertas modalidades, la concentración de IL-2 es de aproximadamente 100 UI/ml a aproximadamente 300 UI/ml.
- En las modalidades, la población aislada de células comprende PBMC humanas.
- 40 En modalidades adicionales, la población de células se criopreserva en un congelador de velocidad controlada.
- En modalidades adicionales, la población de células criopreservadas se descongela.
- 45 En modalidades adicionales, la población de células se siembra para cultivar en la etapa (b) en TCGM a una densidad de aproximadamente  $1 \times 10^8$  células/ml.
- En modalidades adicionales, la población de células se siembra para cultivar en la etapa (b) en TCGM a una densidad de aproximadamente  $1 \times 10^7$  células/ml.
- 50 En modalidades adicionales, la población de células se siembra para cultivar en la etapa (b) en TCGM a una densidad de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células/ml.
- En modalidades adicionales, se siembran aproximadamente  $1 \times 10^8$  células para cultivar en la etapa (b) en TCGM a una densidad de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células/ml.
- 55 En modalidades particulares, la población de células se cultiva en una bolsa de cultivo celular o en un biorreactor.
- En ciertas modalidades, el TCGM comprende además una o más citocinas seleccionadas del grupo que consiste en: IL7, IL-15, IL-9 e IL-21.
- 60 En modalidades adicionales, el TCGM comprende además una o más citocinas seleccionadas del grupo que consiste en: IL-7 e IL-15.
- En las modalidades, el TCGM comprende IL-2.
- 65 En modalidades adicionales, la concentración de una o más citocinas es de aproximadamente 250 UI/ml.

## ES 2 800 906 T3

En modalidades adicionales, la concentración de una o más citocinas es de aproximadamente 25 UI/ml a aproximadamente 500 UI/mL

5 En modalidades adicionales, la población de células se cultiva con un anticuerpo anti-CD3 soluble y un anticuerpo anti-CD28 soluble.

En ciertas modalidades, la concentración del anticuerpo anti-CD3 es de aproximadamente 50 ng/ml.

10 En modalidades particulares, la concentración del anticuerpo anti-CD28 es de aproximadamente 50 ng/ml.

En ejemplos particulares, la población de células de la etapa b) se cultiva durante aproximadamente 12 horas a aproximadamente 48 horas antes de la transducción.

15 En otros ejemplos, la población de células de la etapa b) se cultiva durante aproximadamente 16 horas a aproximadamente 32 horas antes de la transducción.

En las modalidades, la población de células de la etapa b) se cultiva durante 16 horas a 32 horas antes de la transducción.

20 En modalidades adicionales, la población de células de la etapa b) se cultiva durante al menos 18 horas antes de la transducción.

25 En modalidades adicionales, la población de células de la etapa b) se cultiva durante al menos 24 horas antes de la transducción.

En ciertos ejemplos, la población de células de la etapa d) se transduce con un vector retroviral.

30 En las modalidades, la población de células de la etapa d) se transduce con un vector lentiviral.

En modalidades adicionales, se usan aproximadamente  $1 \times 10^9$  TU a aproximadamente  $2 \times 10^9$  TU del vector viral para transducir las  $1 \times 10^8$  células sembradas.

35 En modalidades adicionales, se usan de aproximadamente  $1 \times 10^9$  TU a aproximadamente  $4 \times 10^9$  TU del vector viral para transducir las  $1 \times 10^8$  células sembradas.

En modalidades particulares, el vector viral se diluye al 20 % v/v del volumen de cultivo total.

40 En modalidades particulares, el vector viral se diluye al aproximadamente 20 % a aproximadamente 40 % v/v del volumen de cultivo total.

En modalidades adicionales, la población de células se transduce durante aproximadamente 18 a aproximadamente 48 horas.

45 En modalidades adicionales, la población de células se transduce durante aproximadamente 18 a aproximadamente 36 horas.

En modalidades adicionales, la población de células se transduce durante aproximadamente 24 horas.

50 En las modalidades, el vector viral comprende un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico.

En ciertas modalidades, el CAR comprende: un dominio extracelular que se une a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en: receptor alfa de folato, 5T4, integrina  $\alpha v\beta 6$ , BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, familia de EGFR que incluye ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetal, FR $\alpha$ , GD2, GD3, 'Glypican-3 (GPC3), HLA-A1 + MAGE1, HLA-A2 + MAGE1, HLA-A3 + MAGE1, HLA-A1 + NY-ESO-1, HLA-A2 + NY-ESO-1, HLA-A3 + NY-ESO-1, IL-11R $\alpha$ , IL-13R $\alpha 2$ , Lambda, Lewis-Y, Kappa, Mesotelina, Mucl, Muc16, NCAM, ligandos de NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, Survivina, TAG72, TEM y VEGFR2; un dominio transmembrana derivado de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: CD8 $\alpha$ ; CD4, CD28, CD45, PD1 y CD152; uno o más dominios de señalización coestimuladora intracelular seleccionados del grupo que consiste en: CD28, CD54 (ICAM), CD134 (OX40), CD137 (41BB), CD152 (CTLA4), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1) y CD278 (ICOS); y un dominio de señalización de CD3 $\zeta$ .

65 En modalidades particulares, el dominio extracelular comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une al antígeno.

## ES 2 800 906 T3

- En modalidades adicionales, el dominio transmembrana se deriva de CD8 $\alpha$  o CD28.
- En ciertas modalidades, el uno o más dominios de señalización coestimuladora se seleccionan del grupo que consiste en: CD28, CD134 y CD137.
- 5 En modalidades adicionales, que comprenden un polipéptido de región bisagra.
- En modalidades adicionales, el polipéptido de la región bisagra comprende una región bisagra de IgG1 o CD8 $\alpha$ .
- 10 En modalidades particulares, el CAR comprende además un péptido señal.
- En modalidades particulares, el péptido señal comprende un polipéptido señal de cadena pesada de IgG1, un polipéptido señal de CD8 $\alpha$  o un polipéptido señal del receptor alfa de GM-CSF humano.
- 15 En modalidades adicionales, la población de células en la etapa d) se cultiva para su expansión durante aproximadamente 5 a aproximadamente 8 días.
- En ciertas modalidades, la población de células en la etapa d) se cultiva para su expansión durante aproximadamente 5 días a aproximadamente 8 días en una bolsa de cultivo celular.
- 20 En modalidades adicionales, la población de células en la etapa d) se cultiva para su expansión durante aproximadamente 5 días en una bolsa de cultivo celular y después se cultiva durante aproximadamente 3 días en un biorreactor.
- 25 En modalidades adicionales, la población de células en la etapa d) se cultiva para su expansión durante aproximadamente 5 días a aproximadamente 8 días en un biorreactor.
- En modalidades adicionales, el biorreactor es un biorreactor WAVE o un biorreactor GREX.
- 30 En modalidades particulares, el número de células T se expande al menos 50 veces durante el cultivo de la etapa d).
- En ciertas modalidades, el número de células T se expande al menos 100 veces durante el cultivo de la etapa d).
- En modalidades particulares, el número de células T se expande al menos 200 veces durante el cultivo de la etapa d).
- 35 En modalidades adicionales, el número de células T se expande al menos 300 veces durante el cultivo de la etapa d).
- En modalidades adicionales, el número de células T se expande al menos 400 veces durante el cultivo de la etapa d).
- 40 En modalidades adicionales, el número de células T se expande al menos 500 veces durante el cultivo de la etapa d).
- En modalidades adicionales, el número de células T se expande al menos 600 veces durante el cultivo de la etapa d).
- 45 En ciertas modalidades, el método comprende además recuperar el producto terapéutico de células T producido.
- En ciertas modalidades, la recuperación del producto terapéutico de células T comprende concentrar y lavar las células expandidas en la etapa d).
- 50 En modalidades particulares, el producto terapéutico de células T se concentra y se lava mediante el uso de una centrífuga de flujo semiautomatizada.
- En modalidades adicionales, la centrífuga de flujo semiautomatizada es un Cell Saver 5+ o LOVO.
- 55 En modalidades particulares, el método comprende además criopreservar el producto terapéutico de células T.
- En modalidades adicionales, las células T criopreservadas se descongelan para su uso en un método de terapia celular adoptiva.
- 60 En varios ejemplos, se proporciona una composición que comprende las células T producidas de cualquiera de los ejemplos anteriores descritos más arriba y en otra parte del presente documento, y un excipiente fisiológicamente aceptable.
- 65 En varios otros ejemplos, se proporciona un método para tratar una neoplasia maligna en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto el producto terapéutico de células T de cualquiera de los ejemplos anteriores descritos más arriba y en otra parte del presente documento.

Breve descripción de las figuras

5 La Figura 1 muestra la eficiencia de transducción y el VCN de células transducidas las cuales se transdujeron en diferentes momentos durante el proceso de producción de células T. Las células fueron transducidas con un lentivirus que expresa GFP a  $1-2 \times 10^8$  TU/10<sup>6</sup> PBMC en D0, D1 y D2. El análisis de FACS de las células que expresan GFP con expresión de CD3, CD8 o CD4 determinó que la eficiencia de transducción y VCN fueron más altas en las células transducidas de 20 a 24 horas (D1) después de la activación.

10 La Figura 2 muestra la eficiencia de transducción de células activadas mediante el uso de diferentes métodos. Las PBMC se activaron mediante el uso de (i) anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 unidos a la placa; (ii) anticuerpos solubles anti-CD3 y anti-CD28; y (iii) anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 unidos a perlas. Las células activadas se transdujeron con un lentivirus que expresa CAR anti-CD 19 a  $1-2 \times 10^8$  TU/10<sup>6</sup> PBMC. La eficiencia de transducción y VCN fue mayor en GFP que expresaban los marcadores de células T CD3, CD8 o CD4 que se activaron con anticuerpos solubles anti-CD3 y anti-CD28 en comparación con otros métodos.

15 La Figura 3 muestra que la activación y transducción en bolsas de cultivo celular fue comparable a la transducción en matraces. Las PBMC se activaron a D0 mediante el uso de anticuerpos solubles anti-CD3 y anti-CD28 a una concentración de 50 ng/ml. Las células activadas se transdujeron con un lentivirus que expresa kappaLC a  $3 \times 10^8$  TU/10<sup>6</sup> PBMC en D1. La eficiencia de transducción fue comparable cuando las células se activaron y transdujeron en bolsas de cultivo celular o en matraces. El VCN fue ligeramente mayor en las células que se activaron y transdujeron en bolsas de cultivo celular.

20 La Figura 4 muestra que la expansión de células T entre las PBMC activadas por diferentes métodos fue comparable. Las PBMC se activaron mediante el uso de (i) anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 unidos a la placa; y (ii) anticuerpos solubles anti-CD3 y anti-CD28; o los linfocitos purificados se activaron con el uso de (iii) anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 unidos a perlas. Las PBMC y los linfocitos eran de la misma fuente. Las células activadas se transdujeron con un lentivirus que expresa CAR anti-CD19 a  $1-2 \times 10^8$  TU/10<sup>6</sup> PBMC. La expansión celular entre las PBMC activadas por los tres métodos fue comparable durante todo el período de cultivo de expansión de diez días.

25 La Figura 5 muestra que las PBMC de múltiples donantes mostraron una expansión comparable y robusta. Las PBMC se activaron mediante el uso de anticuerpos solubles anti-CD3 y anti-CD28. Las células activadas se transdujeron con un lentivirus que expresa CAR anti-CD19 a  $1-2 \times 10^8$  TU/10<sup>6</sup> PBMC. Las células activadas y transducidas de múltiples donantes que se cultivaron durante 10 días mostraron velocidades de crecimiento comparables entre sí y con un control no transducido (UTD). También se muestra el número de linfocitos presentes en el día 10 en cada cultivo expandido.

30 La Figura 6 es un análisis representativo de FACS que muestra que la expresión de CAR anti-CD19 fue comparable entre los productos celulares generados a partir de diferentes pacientes, con un promedio de aproximadamente 61 % de marcaje y un intervalo de 29 % a 80 % (n = 5). La qPCR también demostró que el VCN entre los productos celulares fue comparable entre los productos celulares generados a partir de diferentes pacientes.

35 La Figura 7 muestra que la eliminación tumoral específica del antígeno por las células T activadas con el uso de anticuerpos solubles fue tan bueno o mejor que por las células T activadas con el uso de otros métodos. Las PBMC se activaron mediante el uso de (i) anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 unidos a la placa; (ii) anticuerpos solubles anti-CD3 y anti-CD28; y (iii) anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 unidos a perlas. Las células activadas se transdujeron con un lentivirus que expresa CAR anti-CD19 a  $1-2 \times 10^8$  TU/10<sup>6</sup> PBMC. Las células T CAR anti-CD19 expandidas se cultivaron conjuntamente con células Daudi que expresan CD19 o células K562 que no expresan CD19. Las células T CAR anti-CD19 activadas con el uso de anticuerpos solubles mataron las células Daudi de una manera específica del antígeno, pero no las células K562, igual, o mejor que las células T CAR anti-CD19 activadas por los otros métodos.

40 La Figura 8 muestra un experimento representativo de eliminación tumoral específica del antígeno por células T CAR producidas mediante el uso de los métodos contemplados en el presente documento. Las PBMC se activaron mediante el uso de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 solubles se transdujeron con un lentivirus que expresaba CAR anti-CD19 a  $1-2 \times 10^8$  TU/10<sup>6</sup> PBMC. Las células T CAR anti-CD19 mataron las células Daudi que expresan CD19 pero no las células K562 que no expresan CD19.

45 La Figura 9 muestra una comparación del diagrama de flujo de la plataforma de producción de células T de investigación a pequeña escala y la plataforma de producción de fármacos con cGMP clínicas a mayor escala. El proceso a pequeña escala permitió una evaluación de mayor rendimiento de las construcciones CART con la seguridad de que los datos serían comparables para la plataforma de producción con cGMP a gran escala.

50 La Figura 10 muestra un diagrama de flujo de la plataforma de producción de células T mediante el uso de PBMC recién obtenidas, bolsas de cultivo celular y, opcionalmente, un biorreactor WAVE.

55 La Figura 11 muestra un diagrama de flujo de la plataforma de producción de células T mediante el uso de PBMC congeladas, bolsas de cultivo celular y, opcionalmente, un biorreactor WAVE.

La Figura 12 muestra un diagrama de flujo de la plataforma de producción de células T mediante el uso de PBMC recién obtenidas y un biorreactor GREX.

5 La Figura 13 muestra un experimento representativo que compara los fenotipos de los productos finales producidos de células T CAR a partir de métodos de producción a pequeña y gran escala. El análisis de FACS para la expresión de marcadores de superficie celular CD4, CD8, la construcción T CAR, CD56 y CD62L no identificó diferencias significativas en el fenotipo de los productos T CAR finales entre las plataformas.  $p \geq 0,20$  para todos los marcadores de superficie entre las dos plataformas. (n = 3).

10 La Figura 14 muestra la composición celular de PBMC de 18 donantes a partir del uso de un aislamiento con FICOLL™ y lavado realizado en el Sistema de Recuperación de Sangre Autóloga Cell Saver® 5+ (Haemonetics). Las poblaciones de células resultantes se caracterizaron por FACS en cuanto a las células CD45<sup>+</sup>, células T, células T CD4<sup>+</sup>, células T CD8<sup>+</sup>, células B, células NK y monocitos y células dendríticas. Los perfiles celulares fueron consistentes entre los 18 donantes.

La Figura 15 muestra que la producción de células T CAR con diferentes métodos produjo productos celulares finales comparados. Las células T CAR se produjeron mediante el uso de dispositivos a pequeña escala (matraz T25) y a gran escala (GREX100, bolsas de cultivo celular estático y biorreactor WAVE). Las velocidades de crecimiento celular y el número de células expandidas durante un período de cultivo de 10 días fueron comparables entre los métodos. (A). El análisis de FACS mostró que la cantidad de células CD3<sup>+</sup> fue consistente entre los métodos de producción. (B). qPCR mostró que el VCN de las células CD3<sup>+</sup> fue comparable entre los diversos métodos de producción probados.

La Figura 16 muestra un mapa de múltiples construcciones de CAR lentivirales. Las construcciones variaron en lo que respecta a las regiones del promotor, scFV, +/- enlazador, bisagra, transmembrana y dominios de señalización.

La Figura 17 muestra que varios productos de células T CAR mostraron (A) comparables velocidades de crecimiento; (B) VCN; y (C) expresión de la superficie celular de las diferentes construcciones de CAR.

30 La Figura 18 muestra la eliminación tumoral específica del antígeno mediante el uso de células T que expresan CAR. (A). Las células T CAR que expresan anti-BCMA mataron las células tumorales que expresaban BCMA marcadas con éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE); la fluorescencia se midió por FACS. (B). Las células T CAR que expresan anti-BCMA se cultivaron conjuntamente con células K562 y células K562 genéticamente modificadas para expresar BCMA y los sobrenadantes se recogieron 24 horas más tarde y se analizaron para determinar la liberación de IFN- $\gamma$  mediante ELISA. (n = 3).

Descripción detallada

Visión general

40 Los métodos existentes para producir terapias celulares adoptivas son engorrosos y costosos y han presentado una barrera formidable para el uso de ACT como tratamiento generalizado en la clínica. Las composiciones y métodos ofrecen una solución a estos y otros problemas relacionados con la producción de terapias basadas en células. La descripción en general se refiere a métodos mejorados para producir productos terapéuticos de células T. Sin desear estar limitados a ninguna teoría particular, los métodos de la invención contemplados en el presente documento dan como resultado una plataforma de producción de ACT reproducible, confiable y robusta, en comparación con las composiciones de células T existentes en la técnica.

50 En varios ejemplos, se proporcionan métodos para producir terapias celulares adoptivas, composiciones o productos terapéuticos de células efectoras inmunitarias, métodos para expandir células efectoras inmunitarias y plataformas de producción de células efectoras inmunitarias. En ejemplos preferidos particulares, una composición de células efectoras inmunitarias con CAR o TCR modificado se produce mediante los métodos contemplados en el presente documento, lo que puede aumentar aún más la eficacia de una terapia celular adoptiva de células efectoras inmunitarias. Las composiciones celulares producidas que se contemplan en el presente documento son útiles en el tratamiento o la prevención de numerosas afecciones que incluyen, sin limitación, cáncer, enfermedad infecciosa, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria e inmunodeficiencia.

60 En varios ejemplos, un método para producir una composición terapéutica que comprende células efectoras inmunitarias implica obtener una población de células que comprende células efectoras inmunitarias, activar la población de células y cultivar la población de células para expandir las células efectoras inmunitarias. En ejemplos particulares, las células efectoras inmunitarias comprenden células T, y opcionalmente células NK y/o células NKT.

En diversas modalidades, las células efectoras inmunitarias se producen en bolsas de cultivo celular y/o biorreactores.

65 En otras diversas modalidades, las células efectoras inmunitarias se producen en biorreactores.

En una modalidad, un método para producir una composición terapéutica que comprende células T comprende cosechar células de un sujeto y aislar una población de células mediante el uso de un proceso en sistema cerrado. En modalidades particulares, las células pueden aislarse de cualquier fuente fresca o congelada adecuada. En las modalidades, la población aislada de células comprende células mononucleares de sangre periférica (PBMC). La población aislada de células se siembra para iniciar los cultivos y las células T se activan y estimulan al poner en contacto las células con ligandos primarios y coestimuladores. En ejemplos particulares, las poblaciones de células que comprenden células T activadas se transducen con un vector viral para redirigir las células transducidas a un antígeno objetivo particular. En ciertos ejemplos, las células se transducen con un vector viral que codifica un CAR o un TCR modificado. Las células transducidas o las células no transducidas se pueden cultivar en medio de cultivo para expandir las células efectoras inmunitarias, por ejemplo, las células T. Las composiciones de células efectoras inmunitarias producidas pueden usarse después para tratar sujetos que las necesiten o congelarse para su uso posterior.

Las terapias celulares adoptivas producidas mediante el uso de los métodos contemplados en el presente documento son eficaces para producir productos farmacológicos celulares con niveles reproducibles de expansión, perfiles celulares, VCN, y que son efectivos para mediar la eliminación de tumores con especificidad antigénica. Los métodos ofrecen una variabilidad reducida entre pacientes en la producción de terapias celulares adoptivas y son reproducibles, confiables, escalables y transferibles a los procesos de producción con cGMP. En consecuencia, los métodos y composiciones contemplados en el presente documento representan una mejora cuantitativa en comparación con las inmunoterapias de células adoptivas existentes.

La práctica de la invención empleará, a menos que se indique específicamente lo contrario, métodos convencionales de química, bioquímica, química orgánica, biología molecular, microbiología, técnicas de ADN recombinante, genética, inmunología y biología celular que están dentro de la técnica, muchos de los cuales se describen a continuación con fines ilustrativos. Dichas técnicas se explican completamente en la literatura. Ver, por ejemplo, Sambrook, y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3ra Edición, 2001); Sambrook, y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2da Edición, 1989); Maniatis y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982); Ausubel y otros, *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, actualizado en julio de 2008); *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Glover, *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I y II (IRL Press, Oxford, 1985); Anand, *Techniques for the Analysis of Complex Genomes*, (Academic Press, Nueva York, 1992); *Transcription and Translation* (B. Hames y S. Higgins, Eds., 1984); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); Harlow y Lane, *Antibodies*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998) *Current Protocols in Immunology* Q. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach y W. Strober, eds., 1991); *Annual Review of Immunology*; así como monografías en revistas como *Advances in Immunology*.

#### Definiciones

A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que se entiende habitualmente en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en este documento pueden usarse en la práctica o prueba de la materia descrita en la presente, en este documento se describen ejemplos preferidos de composiciones, métodos y materiales. Para los fines de la presente invención, los siguientes términos se definen a continuación.

Los artículos "un", "una" y "el/la" se usan en el presente documento para referirse a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento. Como se usa en este documento, el término "aproximadamente" o "alrededor de" se refiere a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud que varía hasta 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 % con relación a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud de referencia. En modalidades particulares, los términos "aproximadamente" o "alrededor de" cuando preceden a un valor numérico indican el valor más o menos un intervalo de 15 %, 10 %, 5 % o 1 %.

Como se usa en este documento, el término "sustancialmente" se refiere a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud que es 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud de referencia. En una modalidad, "sustancialmente igual" se refiere a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud que produce un efecto, por ejemplo, un efecto fisiológico, que es aproximadamente el mismo que una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud de referencia. A lo largo de esta descripción, a menos que el contexto lo requiera de cualquier otra manera, se entenderá que las palabras "comprende", "comprenden" y "que comprende" implican la inclusión de una etapa o elemento o grupo de etapas o elementos establecidos, pero no la exclusión de cualquier otra etapa o elemento o grupo de etapas o elementos. Por "que consiste en" se entiende que incluye, y se limita a, lo que sigue a la frase "que consiste en". Por lo tanto, la frase "que consiste en" indica que los elementos mencionados son indispensables u obligatorios, y que no pueden estar presentes otros elementos. Se entiende que "consiste esencialmente en" incluye todos los elementos mencionados después de la frase, y se limita a

5 otros elementos que no interfieren o no contribuyen a la actividad o acción especificada en la descripción de los elementos mencionados. Por lo tanto, la frase "que consiste esencialmente en" indica que los elementos mencionados son indispensables u obligatorios, pero que ningún otro elemento es opcional y puede o no estar presente según si afecta o no a la actividad o acción de los elementos mencionados. La referencia en esta descripción a "una modalidad", "una modalidad particular", "una modalidad relacionada", "una cierta modalidad", "otra modalidad" o "una modalidad adicional" o combinaciones de estas significa que una característica, estructura o rasgo particulares descritos en relación con la modalidad se incluye en al menos una modalidad de la presente invención. Por lo tanto, las apariciones de las frases anteriores en varios lugares a lo largo de esta descripción no se refieren necesariamente a la misma modalidad. Además, las características, estructuras o rasgos particulares se pueden combinar de cualquier manera adecuada en una o más modalidades.

15 Como se usa en el presente documento, los términos "producción de células T" o "métodos de producción de células T" o términos comparables se refieren al proceso de producción de una composición terapéutica de células T, dichos métodos de producción pueden comprender uno o más de, o todas las etapas siguientes llevadas a cabo una o más veces en una población de células que comprende células T o una población de células T purificadas: cosecha, aislamiento, lavado, estimulación, activación, modificación, expansión, criopreservación y descongelación, o cualquier combinación adecuada de estas.

20 Los términos "células T" o "linfocitos T" son reconocidos en la técnica y están destinados a incluir timocitos, linfocitos T vírgenes, linfocitos T inmaduros, linfocitos T maduros, linfocitos T en reposo o linfocitos T activados. Las poblaciones ilustrativas de células T adecuadas para su uso en modalidades particulares incluyen, sin limitación, células T auxiliares (HTL; célula T CD4<sup>+</sup>), una célula T citotóxica (CTL; célula T CD8<sup>+</sup>), célula T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, célula T CD4-CD8<sup>+</sup>, o cualquier otro subconjunto de células T. Otras poblaciones ilustrativas de células T adecuadas para su uso en modalidades particulares incluyen, sin limitación, células T que expresan uno o más de los siguientes marcadores: 25 CD3, CD4, CD8, CD27, CD28, CD45RA, CD45RO, CD62L, CD127, CD197 y HLA-DR y, si se desea, pueden aislarse adicionalmente mediante técnicas de selección positiva o negativa.

30 Una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC) se define como cualquier célula sanguínea con un núcleo redondo (es decir, un linfocito, un monocito o un macrófago). Estas células sanguíneas son un componente fundamental en el sistema inmunitario para combatir las infecciones y adaptarse a los intrusos. La población de linfocitos consiste en células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, células B y células asesinas naturales, monocitos CD14<sup>+</sup> y basófilos/neutrófilos/eosinófilos/células dendríticas. Estas células a menudo se separan de la sangre completa o de los leucopacks mediante el uso de FICOLL™, un polisacárido hidrofílico que separa las capas de sangre, donde los monocitos y linfocitos forman una capa leucocitaria debajo de una capa de plasma. En una modalidad, "PBMC" se refiere a una población de células que comprende al menos células T, y opcionalmente células NK, y células presentadoras de antígeno.

40 Las "células presentadoras de antígeno" se refieren a un grupo heterogéneo de células inmunocompetentes que median la respuesta inmunitaria celular al procesar y presentar antígenos a las células T. Las células presentadoras de antígeno incluyen, sin limitación, macrófagos, células dendríticas, células de Langerhans, linfocitos B, plaquetas y células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC).

45 Las aAPC pueden fabricarse al modificar células K562, U937, 721.221, T2 y C1R para dirigir la expresión y secreción estables de una variedad de moléculas coestimuladoras y citocinas. En un ejemplo particular, las aAPC K32 o U32 se usan para dirigir la expresión de una o más moléculas estimuladoras basadas en anticuerpos en la superficie celular de las aAPC. Las poblaciones de células T pueden expandirse mediante aAPC que expresan una variedad de moléculas coestimuladoras que incluyen, sin limitación, CD137L (4-1BBL), CD134L (OX40L) y/o CD80 o CD86. Finalmente, las aAPC proporcionan una plataforma eficiente para expandir las células T genéticamente modificadas y para mantener la expresión de CD28 en las células T CD8. Las aAPC se proporcionan en los documentos WO 50 03/057171 y US2003/0147869.

55 Como se usa en el presente documento, el término "proliferación" se refiere a un aumento en la división celular, ya sea división simétrica o asimétrica de las células. En modalidades particulares, "proliferación" se refiere a la división simétrica o asimétrica de las células T. Un "aumento de la proliferación" ocurre cuando hay un incremento en el número de células en una muestra tratada en comparación con las células en una muestra no tratada.

60 Una "célula efectora inmunitaria" es cualquier célula del sistema inmunitario que tiene una o más funciones efectoras (por ejemplo, actividad citotóxica para matar células, secreción de citocinas, inducción de ADCC y/o CDC). Las células efectoras inmunitarias ilustrativas contempladas en el presente documento son linfocitos T, en particular células T citotóxicas (CTL; células T CD8<sup>+</sup>) y células T auxiliares (HTL; células T CD4<sup>+</sup>). Como entenderá un experto en la materia, también se pueden usar otras células como células efectoras inmunitarias con los CAR como se describe en el presente documento. En particular, las células efectoras inmunitarias incluyen además células NK, células NKT, neutrófilos y macrófagos. En modalidades particulares, las células T y uno o más de otros tipos de células tales como células NK, células NKT, neutrófilos y/o macrófagos se modifican genéticamente y se expanden mediante el uso de 65 los métodos de producción contemplados en el presente documento.

Las "células T modificadas" se refieren a las células T que se han modificado mediante la introducción de un polinucleótido que codifica un CAR o TCR modificado que se contempla en el presente documento. Las células T modificadas incluyen modificaciones genéticas y no genéticas (por ejemplo, episomales o extracromosómicas).

5 Como se usa en el presente documento, el término "diseñado genéticamente" o "modificado genéticamente" se refiere a la adición de material genético adicional en forma de ADN o ARN en el material genético total en una célula.

Los términos "células genéticamente modificadas", "células modificadas" y "células redirigidas" se usan indistintamente.

10 Como se usa en el presente documento, el término "terapia génica" se refiere a la introducción de material genético adicional en forma de ADN o ARN en el material genético total en una célula que restaura, corrige o modifica la expresión de un gen, o con el fin de expresar un polipéptido terapéutico, por ejemplo, un TCR o CAR y/o una o más citocinas. En ejemplos particulares, las células T se modifican para expresar un CAR o TCR modificado sin modificar el genoma de las células, por ejemplo, mediante la introducción de un vector episomal que expresa el TCR o CAR en la célula.

15 El término "*ex vivo*" se refiere generalmente a actividades que tienen lugar fuera de un organismo, como la experimentación o las mediciones realizadas en o sobre tejido vivo en un ambiente artificial fuera del organismo, preferentemente con una alteración mínima de las condiciones naturales. En modalidades particulares, los procedimientos "*ex vivo*" implican células o tejidos vivos tomados de un organismo y cultivados o modulados en un aparato de laboratorio, generalmente en condiciones estériles, y típicamente durante unas pocas horas o hasta aproximadamente 24 horas, pero que incluyen hasta 48 o 72 horas, según las circunstancias. En ciertas modalidades, tales tejidos o células pueden cosecharse y congelarse, y después descongelarse para su tratamiento *ex vivo*. Los experimentos o procedimientos de cultivo de tejidos que duran más de unos pocos días con el uso de células o tejidos vivos se consideran típicamente "*in vitro*", aunque en ciertas modalidades, este término se puede usar indistintamente con *ex vivo*.

20 El término "*in vivo*" se refiere generalmente a actividades que tienen lugar dentro de un organismo, tales como la autorrenovación celular y la expansión de las células. En una modalidad, el término "expansión *in vivo*" se refiere a la capacidad de una población celular de aumentar su número *in vivo*.

25 El término "estimulación" se refiere a una respuesta primaria inducida por la unión de una molécula estimuladora (por ejemplo, un complejo TCR/CD3) con su ligando correspondiente mediando así un evento de transducción de señales que incluye, sin limitación, la transducción de señales a través del complejo TCR/CD3.

30 Una "molécula estimuladora" se refiere a una molécula en una célula T que se une específicamente con un ligando estimulador correspondiente.

35 Un "ligando estimulador", como se usa en el presente documento, significa un ligando que cuando está presente en una célula presentadora de antígeno (por ejemplo, un aAPC, una célula dendrítica, una célula B y similares) puede unirse específicamente con una pareja de unión correspondiente (referida en el presente documento como una "molécula estimuladora") en una célula T, mediando así una respuesta primaria de la célula T, que incluye, sin limitación, activación, iniciación de una respuesta inmunitaria, proliferación y similares. Los ligandos estimuladores incluyen, entre otros, ligandos o agentes de unión a CD3, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD3 y ligandos o agentes de unión a CD2, por ejemplo, anticuerpo anti-CD2.

40 El término "activación" se refiere al estado de una célula T que ha sido suficientemente estimulada para inducir una proliferación celular detectable. En modalidades particulares, la activación también puede estar asociada con la producción inducida de citocinas y funciones efectoras detectables. El término "células T activadas" se refiere, entre otras cosas, a las células T que proliferan. Las señales generadas a través del TCR solo son insuficientes para la activación completa de la célula T y también se requieren una o más señales secundarias o coestimuladoras. Por lo tanto, la activación de células T comprende una señal de estimulación primaria a través del complejo TCR/CD3 y una o más señales coestimuladoras secundarias. La coestimulación se puede evidenciar por la proliferación y/o producción de citocinas por las células T que han recibido una señal de activación primaria, como la estimulación a través del complejo CD3/TCR o a través de CD2.

45 Una "señal coestimuladora" se refiere a una señal que, en combinación con una señal primaria, como la unión de TCR/CD3, conduce a la proliferación de células T, la producción de citocinas y/o la regulación positiva o negativa de moléculas particulares.

50 Un "ligando coestimulador" se refiere a una molécula que se une a una molécula coestimuladora. Un ligando coestimulador puede ser soluble o proporcionarse en una superficie. Un ligando coestimulador puede incluir, sin limitación, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, ligando coestimulador inducible (ICOS-L), molécula de adhesión intercelular (ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, receptor beta de linfotóxina, 3/TR6, ILT3, ILT4, HVEM, un agonista o anticuerpo que se une al receptor de ligando Toll y un ligando

que se une específicamente con B7-H3. Un ligando coestimulador también abarca, entre otros, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este que se une específicamente con una molécula coestimuladora presente en una célula T, tal como, sin limitación, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno 1 asociado a la función linfocítica (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 y un ligando que se une específicamente con CD83.

5 Una "molécula coestimuladora" se refiere a la pareja de unión correspondiente en una célula T, por ejemplo, CD28 que se une específicamente con un ligando coestimulador, mediando así una respuesta coestimuladora de la célula T, que incluye, sin limitación, la proliferación.

10 "Autólogo", como se usa en el presente documento, se refiere a células del mismo sujeto.

"Alogénico", como se usa en el presente documento, se refiere a células de la misma especie que difieren genéticamente de la célula en comparación. "Singénico", como se usa en el presente documento, se refiere a células de un sujeto diferente que son genéticamente idénticas a la célula en comparación. "Xenogénico", como se usa en el presente documento, se refiere a células de una especie diferente a la célula en comparación.

15 Como se usa en el presente documento, los términos "individuo" y "sujeto" a menudo se usan indistintamente y se refieren a cualquier animal que presente un síntoma de cáncer, enfermedad infecciosa, inmunodeficiencia, enfermedad inflamatoria o trastorno autoinmunitario que pueda tratarse con los vectores de terapia génica, productos terapéuticos basados en células y métodos descritos en otra parte del presente documento. Los sujetos adecuados (por ejemplo, Pacientes) incluyen animales de laboratorio (como ratones, ratas, conejos o conejillos de Indias), animales de granja y animales domésticos o mascotas (como gatos o perros). Se incluyen primates no humanos y, preferentemente, seres humanos. Los sujetos típicos incluyen seres humanos que tienen cáncer, enfermedad infecciosa, inmunodeficiencia, enfermedad inflamatoria o trastorno autoinmunitario, que han sido diagnosticados con

20 cáncer, enfermedad infecciosa, inmunodeficiencia, enfermedad inflamatoria o trastorno autoinmunitario, o que están en riesgo de tener, o tienen, un cáncer, enfermedad infecciosa, inmunodeficiencia, enfermedad inflamatoria o trastorno autoinmunitario.

30 Como se usa en el presente documento, el término "paciente" se refiere a un sujeto que ha sido diagnosticado con una indicación particular que puede tratarse con los vectores de terapia génica, los productos terapéuticos basados en células y los métodos descritos en otra parte del presente documento.

35 Como se usa en el presente documento "tratamiento" o "tratar", incluye cualquier efecto beneficioso o conveniente sobre los síntomas o la patología de una enfermedad o afección patológica, y puede incluir incluso reducciones mínimas en uno o más marcadores medibles de la enfermedad o afección que se está tratando, por ejemplo, un cáncer. El tratamiento puede incluir opcionalmente una mejora o una reducción completa de uno o más síntomas de la enfermedad o afección, o el retraso de la progresión de la enfermedad o afección. El "tratamiento" no indica necesariamente la erradicación o cura completa de la enfermedad o afección, o los síntomas asociados de esta.

40 Como se usa en el presente documento, "prevenir" y palabras similares como "prevenido", "que previene", etc., indican un enfoque para prevenir, inhibir o reducir la probabilidad de aparición o recurrencia de una enfermedad o afección, por ejemplo, un cáncer. También se refiere a retrasar el inicio o la recurrencia de una enfermedad o afección o retrasar la aparición o recurrencia de los síntomas de una enfermedad o afección. Como se usa en el presente documento, "prevención" y palabras similares incluyen además reducir la intensidad, el efecto, los síntomas y/o la carga de una

45 enfermedad o afección antes del inicio o la recurrencia de la enfermedad o afección.

50 Como se usa en el presente documento, el término "cantidad" se refiere a "una cantidad eficaz" o "una cantidad eficaz" de una célula terapéutica modificada genéticamente, por ejemplo, una célula T, para lograr un resultado profiláctico o terapéutico beneficioso o deseado, que incluye resultados clínicos.

Una "cantidad con eficacia profiláctica" se refiere a una cantidad de una célula terapéutica modificada genéticamente que es efectiva para lograr el resultado profiláctico deseado. Típicamente pero no necesariamente, dado que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes o en una etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad con eficacia profiláctica es menor que la cantidad con eficacia terapéutica.

55 Una "cantidad con eficacia terapéutica" de una célula terapéutica modificada genéticamente puede variar de acuerdo con factores como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad de las células T para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad con eficacia terapéutica es también aquella en la que los efectos terapéuticamente beneficiosos compensan los efectos tóxicos o perjudiciales del virus o las células terapéuticas transducidas. El término "cantidad con eficacia terapéutica" incluye una cantidad que es eficaz para "tratar" a un sujeto (por ejemplo, un paciente). Cuando se indica una cantidad terapéutica, un médico puede determinar la cantidad precisa de las composiciones de la presente descripción a administrar teniendo en cuenta las diferencias individuales en edad, peso, tamaño del tumor, extensión de la infección o metástasis y el estado del paciente (sujeto).

60

65 Como se usa en el presente documento, el término "cáncer" se refiere generalmente a una clase de enfermedades o afecciones en las que las células anormales se dividen sin control y pueden invadir los tejidos cercanos.

5 Como se usa en este documento, el término "maligno" se refiere a un cáncer en el que un grupo de células tumorales muestra uno o más de crecimiento incontrolado (es decir, división más allá de los límites normales), invasión (es decir, intrusión y destrucción de tejidos adyacentes), y metástasis (es decir, propagación a otros lugares del cuerpo a través de la linfa o la sangre). Como se usa en el presente documento, el término "metástasis" se refiere a la propagación del cáncer de una parte del cuerpo a otra. Un tumor formado por células que se han diseminado se denomina "tumor metastásico" o "metástasis". El tumor metastásico contiene células que son similares a las del tumor original (primario).

10 Como se usa en el presente documento, el término "benigno" o "no maligno" se refiere a tumores que pueden crecer más pero no se propagan a otras partes del cuerpo. Los tumores benignos son autolimitados y generalmente no invaden ni hacen metástasis.

15 Una "célula cancerosa" o "célula tumoral" se refiere a una célula individual de crecimiento o tejido canceroso. Un tumor se refiere generalmente a una hinchazón o lesión formada por un crecimiento anormal de células, que puede ser benigno, premaligno o maligno. La mayoría de los cánceres forman tumores, pero algunos, por ejemplo, leucemia, no necesariamente forman tumores. Para aquellos cánceres que forman tumores, los términos cáncer (célula cancerosa) y tumor (célula tumoral) se usan indistintamente. La cantidad de un tumor en un individuo es la "carga tumoral" que se puede medir como el número, el volumen o el peso del tumor.

20 Una "enfermedad infecciosa" se refiere a una enfermedad que puede transmitirse de persona a persona o de organismo a organismo, y es causada por un agente microbiano (por ejemplo, el resfriado común). Las enfermedades infecciosas son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, hepatitis, enfermedades de transmisión sexual (por ejemplo, Clamidia, gonorrea), tuberculosis, VIH/SIDA, difteria, hepatitis B, hepatitis C, cólera y gripe.

25 Una "enfermedad autoinmunitaria" se refiere a una enfermedad en la cual el cuerpo produce una respuesta inmunogénica (es decir, del sistema inmunitario) a algún componente de su propio tejido. En otras palabras, el sistema inmunitario pierde su capacidad de reconocer algunos tejidos o sistemas dentro del cuerpo como "propios" y los detecta y ataca como si fuera extraño. Las enfermedades autoinmunitarias se pueden clasificar en aquellas en las que se afecta un órgano de manera predominante (por ejemplo, anemia hemolítica y tiroiditis antiinmune), y aquellas en las que el proceso de la enfermedad autoinmunitaria se difunde a través de muchos tejidos (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico). Por ejemplo, se cree que la esclerosis múltiple es causada por las células T que atacan las vainas que rodean las fibras nerviosas del cerebro y la médula espinal. Esto resulta en pérdida de coordinación, debilidad y visión borrosa. Las enfermedades autoinmunitarias son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Grave, lupus, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, anemia hemolítica, tiroiditis antiinmune, lupus eritematoso sistémico, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, colitis, diabetes, esclerodermia, psoriasis y similares.

40 Una "inmunodeficiencia" significa el estado de un paciente cuyo sistema inmunitario se ha deprimido por una enfermedad o por la administración de productos químicos. Esta afección hace que el sistema tenga deficiencia en la cantidad y el tipo de células sanguíneas necesarias para defenderse de una sustancia extraña. Las afecciones o enfermedades de inmunodeficiencia son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida), SCID (enfermedad de inmunodeficiencia combinada severa), deficiencia selectiva de IgA, inmunodeficiencia variable común, agammaglobulinemia ligada al cromosoma X, enfermedad granulomatosa crónica, síndrome de hiper-IgM y diabetes.

45 Como se usa en el presente documento, el término "enfermedad inflamatoria" se refiere a una afección inflamatoria aguda o crónica, que puede resultar de infecciones o causas no infecciosas. Varias causas infecciosas incluyen meningitis, encefalitis, uveítis, colitis, tuberculosis, dermatitis y síndrome de dificultad respiratoria del adulto. Las causas no infecciosas incluyen trauma (quemaduras, cortes, contusiones, lesiones por aplastamiento), enfermedades autoinmunitarias y episodios de rechazo de órganos.

50 Por "mejorar" o "promover", o "aumentar" o "expandir" se refiere generalmente a la capacidad de una composición contemplada en este documento para producir, provocar o causar una mayor respuesta fisiológica (es decir, efectos posteriores) en comparación con la respuesta causada ya sea por un vehículo o una molécula/composición de control. Una respuesta fisiológica medible puede incluir un aumento en la expansión, activación, proliferación de células T y/o un aumento en la capacidad de muerte de células cancerosas, entre otros evidentes a partir de la comprensión de la técnica y la descripción en este documento. Una cantidad "aumentada" o "mejorada" es típicamente una cantidad "estadísticamente significativa", y puede incluir un aumento que es 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más veces (por ejemplo, 500, 1000 veces) (incluidos todos los números enteros y decimales entre y por encima de 1, por ejemplo, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, etc.) la respuesta producida por el vehículo o una composición de control.

60 Por "disminuir", "aminorar", "atenuar", "reducir" o "mitigar" se refiere generalmente a la capacidad de la composición contemplada en este documento para producir, provocar o causar una respuesta fisiológica menor (es decir, efectos posteriores) en comparación a la respuesta causada por el vehículo o una molécula/composición de control. Una cantidad "disminuida" o "reducida" es típicamente una cantidad "estadísticamente significativa", y puede incluir una disminución que es 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más veces (por ejemplo, 500, 1000 veces)

(incluidos todos los números enteros y decimales entre y por encima de 1, por ejemplo, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, etc.) la respuesta (respuesta de referencia) producida por el vehículo, una composición de control o la respuesta en un linaje celular particular.

5 Por "mantener" o "preservar" o "mantenimiento" o "sin cambio" o "sin cambio sustancial" o "sin disminución sustancial" se refiere generalmente a la capacidad de una composición contemplada en este documento para producir, provocar o causar una respuesta fisiológica menor (es decir, efectos posteriores) en una célula, en comparación con la respuesta causada por un vehículo, una molécula/composición de control o la respuesta en un linaje celular particular. Una respuesta comparable es aquella que no es diferente significativamente o diferente cuantitativamente de la  
10 respuesta de referencia.

Los términos "afinidad de unión específica" o "se une específicamente" o "unido específicamente" o "unión específica" o "dirigido específicamente" como se usa en el presente documento, describen la unión de una molécula a otra con una mayor afinidad de unión que la unión de fondo. Un dominio de unión (o un CAR que comprende un dominio de  
15 unión o una proteína de fusión que contiene un dominio de unión) "se une específicamente" a una molécula objetivo si se une o se asocia con una molécula objetivo con una afinidad o  $K_a$  (es decir, una constante de asociación en equilibrio de una interacción de unión particular con unidades de  $1/M$ ) de, por ejemplo, mayor o igual que aproximadamente  $10^5 M^{-1}$ . En ciertas modalidades, un dominio de unión (o una proteína de fusión de este) se une a un objetivo con una  $K_a$  mayor o igual que aproximadamente  $10^6 M^{-1}$ ,  $10^7 M^{-1}$ ,  $10^8 M^{-1}$ ,  $10^9 M^{-1}$ ,  $10^{10} M^{-1}$ ,  $10^{11} M^{-1}$ ,  $10^{12} M^{-1}$  o  $10^{13} M^{-1}$ . Los dominios de unión de "alta afinidad" (o proteínas de fusión de cadena sencilla de estos) se refieren a aquellos dominios de unión con una  $K_a$  de al menos  $10^7 M^{-1}$ , al menos  $10^8 M^{-1}$ , al menos  $10^9 M^{-1}$ , al menos  $10^{10} M^{-1}$ , al menos  $10^{11} M^{-1}$ , al menos  $10^{12} M^{-1}$ , al menos  $10^{13} M^{-1}$  o mayor.

Alternativamente, la afinidad puede ser definida como una constante de disociación en equilibrio ( $K_d$ ) de una interacción de unión particular con unidades de  $M$  (por ejemplo,  $10^{-5} M$  a  $10^{-13} M$ , o menos). Las afinidades de los polipéptidos del dominio de unión y las proteínas CAR de acuerdo con la presente descripción se pueden determinar fácilmente mediante el uso de técnicas convencionales, por ejemplo, mediante ELISA competitivo (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), o mediante asociación de unión, o ensayos de desplazamiento mediante el uso de ligandos marcados, o mediante el uso de un dispositivo de resonancia de plasmones de superficie como el Biacore T100, que está disponible de Biacore, Inc., Piscataway, NJ, o tecnología de biosensores ópticos como el sistema EPIC o EnSpire que están disponibles de Corning y Perkin Elmer respectivamente (*ver también*, por ejemplo, Scatchard y otros (1949) Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660; y las patentes de los Estados Unidos núms. 5,283,173; 5,468,614, o el equivalente).

35 En una modalidad, la afinidad de la unión específica es aproximadamente 2 veces mayor que la unión de fondo, aproximadamente 5 veces mayor que la unión de fondo, aproximadamente 10 veces mayor que la unión de fondo, aproximadamente 20 veces mayor que la unión de fondo, aproximadamente 50 veces mayor que la unión de fondo, aproximadamente 100 veces mayor que la unión de fondo, o aproximadamente 1000 veces mayor que la unión de fondo o más.

40 Un "antígeno (Ag)" se refiere a un compuesto, composición o sustancia que puede estimular la producción de anticuerpos o una respuesta de células T en un animal, incluidas las composiciones (como una que incluye una proteína específica del tumor) que se inyectan o absorben en un animal. Un antígeno reacciona con los productos de la inmunidad humoral o celular específica, incluidos los inducidos por antígenos heterólogos, como los antígenos descritos. Un "antígeno objetivo" o "antígeno de interés objetivo" es un antígeno para el cual se diseña un dominio de unión de un CAR o TCR modificado, que se contemplan en el presente documento, para unirse a él.  
45

Un "epítipo" o "determinante antigénico" se refiere a la región de un antígeno al que se une un agente de unión.

50 Un "péptido aislado" o un "polipéptido aislado" y similares, como se usa en el presente documento, se refieren al aislamiento, síntesis y/o purificación *in vitro* de un péptido o molécula de polipéptido recombinantes o sintéticos o de un péptido o polipéptido de origen no natural, de un entorno celular, y de la asociación con otros componentes de la célula, es decir, no está asociado significativamente con sustancias *in vivo*.

55 Como se usa en el presente documento, "polinucleótido aislado" se refiere al aislamiento, síntesis y/o purificación *in vitro* de un polinucleótido recombinante, sintético o no natural, por ejemplo, un ADN complementario aislado (ADNc) u otro polinucleótido que no existe en la naturaleza y que se ha producido artificialmente. En modalidades particulares, un polinucleótido aislado se refiere a un polinucleótido recombinante, sintético o no natural que se ha purificado de las secuencias que lo flanquean en un estado natural, por ejemplo, un fragmento de ADN que se ha eliminado de las secuencias que normalmente están adyacentes al fragmento.  
60

Preferentemente, las terapias celulares producidas mediante el uso de los métodos contemplados en el presente documento están libres de endotoxinas y se producen de acuerdo con las prácticas de cGMP. Como se usa en el presente documento, el término "libre de endotoxinas" se refiere a recipientes y/o composiciones que contienen como máximo cantidades traza (es decir, cantidades que no tienen efectos fisiológicos adversos para un sujeto) de endotoxina, y preferentemente cantidades indetectables de endotoxina. En una modalidad, el término "libre de  
65

endotoxinas" se refiere a composiciones que están al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % libres de endotoxinas. Las endotoxinas son toxinas asociadas con ciertas bacterias, típicamente bacterias gram-negativas, aunque las endotoxinas se pueden encontrar en bacterias gram-positivas, como *Listeria monocytogenes*. Las endotoxinas más frecuentes son los lipopolisacáridos (LPS) o los lipooligosacáridos (LOS) que se encuentran en la membrana externa de varias bacterias Gram negativas, y que representan una característica patogénica central en la capacidad de estas bacterias para provocar enfermedades. Pequeñas cantidades de endotoxina en seres humanos pueden producir fiebre, una disminución de la presión arterial y la activación de la inflamación y la coagulación, entre otros efectos fisiológicos adversos. Por lo tanto, a menudo es conveniente eliminar la mayoría o todas las trazas de endotoxina de los envases de medicamentos, ya que incluso pequeñas cantidades pueden causar efectos adversos en los seres humanos. Las endotoxinas se pueden eliminar de los recipientes mediante el uso de métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, los recipientes se pueden limpiar en equipos de lavado con filtro HEPA con agua libre de endotoxinas, se despirogenan a 250 °C y se empaquetan de forma limpia en estaciones de trabajo con filtro HEPA ubicadas dentro de una sala limpia clase 100/10 (por ejemplo, una sala limpia de clase 100, no contiene más de 100 partículas mayores de media micra en un pie cúbico de aire).

Como se usa en el presente documento, el término "buenas prácticas de producción actuales (cGMP)" se refiere al control y la gestión de la producción y las pruebas de control de calidad de alimentos, productos farmacéuticos y dispositivos médicos. cGMP no necesariamente depende del muestreo, sino que se basa en la documentación de cada aspecto del proceso, las actividades y las operaciones relacionadas con la producción de medicamentos y dispositivos médicos. Si la documentación que muestra cómo se fabricó y probó el producto (lo que permite la trazabilidad y, en caso de problemas futuros, la retirada del mercado) no es correcta ni está en orden, entonces el producto no cumple con las especificaciones requeridas y se considera contaminado (es decir, adulterado en los Estados Unidos). Además, cGMP generalmente requiere que todos los equipos de producción y prueba hayan sido calificados como adecuados para su uso, y que todas las metodologías y procedimientos operativos (por ejemplo, producción, limpieza y pruebas analíticas) utilizados en el proceso de producción de medicamentos hayan sido validados de acuerdo con las especificaciones predeterminadas para demostrar que pueden realizar su(s) supuesta(s) función(es). En los Estados Unidos, la frase "buenas prácticas de producción actuales" aparece en 501(B) de la Ley de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos de 1938 (21 U.S.C. § 351).

#### Métodos de producción de células T

Actualmente, los métodos de producción de células T existentes incluyen varias etapas complejas para el aislamiento, la activación, transducción y expansión de las células T CAR. En contraste, los presentes inventores usaron un modelo de investigación a pequeña escala para desarrollar una plataforma de producción de células T de sistema cerrado simple, robusta, bien caracterizada, flexible, que se transfirió al proceso de producción con cGMP clínicas a gran escala para células T CAR modificadas.

En diversas modalidades, las células se producen mediante el uso de un sistema de procesamiento cerrado, o en combinación con un sistema de procesamiento celular cerrado. Los sistemas de procesamiento celular cerrado automatizan procesos que incluyen tratamiento, centrifugación, incubación, adición de medios, selección de células, lavado de células y llenado y acabado final dentro de recipientes "cerrados" o resellables. Los sistemas de procesamiento celular cerrado integran y automatizan los procesos y replican muchas tareas manuales controladas cualitativamente para proporcionar una calidad consistente e independiente del operador.

Los beneficios asociados con un sistema automatizado de procesamiento celular cerrado incluirían una reducción significativa en el coste de las terapias (típicamente 25-90 %) y el número de operadores requeridos (típicamente > 70 %); menor dependencia de mano de obra calificada; ahorros significativos en inversión de capital a través de un mejor uso de las instalaciones (típicamente 30-50 %); calidad mejorada y menos eventos de calidad; y la capacidad de escalar y escalar más rápidamente para satisfacer las demandas del mercado.

En varios ejemplos, un método para producir composiciones terapéuticas de células T comprende la obtención de una población de células que comprende células efectoras inmunitarias y células presentadoras de antígeno mediante el uso de un proceso con un sistema cerrado. En ciertas modalidades, la población aislada de células se siembra a una densidad particular para iniciar los cultivos y las células T se activan y estimulan al poner en contacto las células con ligandos primarios y coestimuladores. En ejemplos particulares, las poblaciones de células que comprenden células T activadas se transducen con un vector viral que codifica un CAR o TCR modificado y se cultivan para expandir las células T. Las composiciones de células efectoras inmunitarias producidas que comprenden las células T terapéuticas pueden usarse después para tratar sujetos que las necesitan o congelarse para su uso posterior.

#### 1. Fuente de células T

En ejemplos particulares, las células T se pueden obtener de varias fuentes que incluyen, sin limitación, sangre periférica, células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de ganglios linfáticos, sangre del cordón umbilical, tejido de timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, derrame pleural, tejido del bazo y tumores. En un ejemplo, las células T también se pueden obtener a partir de una línea de células T cultivadas, por ejemplo, Jurkat, SupT1, etc. En las modalidades, se usa una población de células que comprende células T, PBMC, en los métodos

de producción contemplados en el presente documento. En otros ejemplos, se usa una población aislada o purificada de células T en los métodos de producción contemplados en el presente documento.

5 En una modalidad, las fuentes de células T también se pueden obtener comercialmente, por ejemplo, Sanguine Biosciences.

## 2. Cosecha de células

10 La presente invención contempla la producción de composiciones de células T mejoradas. Las células pueden ser autólogas/autogénicas ("propias") o no autólogas ("no propias", por ejemplo, alogénicas, singénicas o xenogénicas). En un ejemplo, las células se obtienen de un sujeto mamífero. En otro ejemplo, las células se obtienen de un sujeto primate. En las modalidades, las células proporcionadas se obtienen de un sujeto humano.

15 En diversas modalidades, las poblaciones de células proporcionadas que comprenden células T se obtienen de un individuo y se someten a los métodos de producción contemplados en el presente documento. En una modalidad, las células proporcionadas provienen de la sangre circulante de un individuo y se obtienen mediante un método de aféresis, por ejemplo, leucocitaféresis. El producto de aféresis puede contener linfocitos, que incluyen células T, monocitos, granulocitos, células B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y plaquetas, o puede ser un producto de leucocitaféresis que comprende linfocitos, que incluyen células T, monocitos, granulocitos, células B, y otros glóbulos blancos nucleados. En una modalidad, las células obtenidas por aféresis pueden lavarse para eliminar la fracción de plasma y colocar las células en un tampón o medio apropiado para el procesamiento posterior. Las células se pueden lavar con PBS o con otra solución adecuada que carezca de calcio, magnesio y la mayor parte, o todos los demás, cationes divalentes.

25 Una vez que se ha obtenido una población de células que comprende células T, se pueden determinar los conteos de células y la viabilidad de las células dentro de la población de células, la población o porciones de estas se pueden criopreservar para su uso o análisis futuros, y las células en la población, por ejemplo, PBMC, pueden caracterizarse mediante el uso de varios paneles de marcadores celulares, por ejemplo, CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD19, CD28, CD45RA, CD45RO, CD61, CD62L, CD66b, CD127 y HLA-DR.

30 En modalidades particulares, el volumen de células obtenidas por aféresis usadas en los métodos de producción contemplados en el presente documento es de aproximadamente 50 ml a aproximadamente 500 ml, aproximadamente 50 ml a aproximadamente 250 ml, aproximadamente 50 ml a aproximadamente 200 ml, aproximadamente 100 ml a aproximadamente 500 ml, aproximadamente 100 ml a aproximadamente 250 ml, o aproximadamente 100 ml a aproximadamente 200 ml, o cualquier intervalo intermedio de estos.

35 En ciertas modalidades, el volumen de células obtenidas por aféresis usadas en los métodos de producción contemplados en el presente documento es de aproximadamente 25 ml, aproximadamente 50 ml, aproximadamente 75 ml, aproximadamente 100 ml, aproximadamente 125 ml, aproximadamente 150 ml, aproximadamente 175 ml, aproximadamente 200 ml, aproximadamente 225 ml, aproximadamente 250 ml, aproximadamente 275 ml, aproximadamente 300 ml, aproximadamente 325 ml, aproximadamente 350 ml, aproximadamente 375 ml, aproximadamente 400 ml, aproximadamente 425 ml, aproximadamente 450 ml, aproximadamente 475 ml o aproximadamente 500 ml, o cualquier volumen intermedio de estos.

## 45 3. Aislamiento de PBMC

En las modalidades, se usa una población de PBMC en los métodos de producción de células T contemplados en la presente descripción. En ciertas modalidades, las PBMC que comprenden células T pueden obtenerse a partir de una unidad de sangre o fracción de aféresis recolectada de un sujeto mediante el uso de cualquier número de técnicas conocidas por la persona experta, tales como centrifugación y sedimentación, por ejemplo, separación con FICOLL™, separación con PERCOLL™, etc.

55 En ciertas modalidades, las PBMC recogidas por aféresis se aíslan en un gradiente de FICOLL™ o PERCOLL™ mediante el uso de una centrifuga de flujo semiautomatizada, por ejemplo, el procesador de células Cobe 2991, el Cell Saver 5 o similares. En algunas modalidades, las PBMC recogidas por aféresis se aíslan sin el uso de gradiente de FICOLL™ o PERCOLL™ mediante el uso de un dispositivo de elutriación centrífuga de contraflujo, por ejemplo, Terumo BCT ELUTRA®, o similares. El uso de Cell Saver 5 permite el procesamiento en sistema cerrado del material de partida de PBMC a través de Ficoll, así como la concentración final y el lavado de las composiciones de células T producidas en un dispositivo. El uso del sistema cerrado simplifica la producción al minimizar el equipamiento necesario para el procesamiento con cGMP y da como resultado PBMC homogéneas y reproduciblemente puras o composiciones de células T finales.

60 En una modalidad, las PBMC se aíslan mediante el uso de un dispositivo de elutriación centrífuga de contracorriente ELUTRA® y se lavan en un Cell Saver 5+ o LOVO.

65

En algunas modalidades, después del aislamiento de PBMC, los linfocitos T citotóxicos y auxiliares pueden clasificarse en subpoblaciones de células T vírgenes, de memoria y efectoras antes o después de la activación, expansión y/o modificación genética, mediante el uso de un dispositivo de sistema cerrado y reactivos cGMP por ejemplo, CliniMACS.

5 Después del aislamiento, se pueden determinar los conteos y la viabilidad de las células PBMC, se pueden criopreservar las PBMC o porciones de estas para su uso o análisis futuros, y se pueden caracterizar las PBMC mediante el uso de varios paneles de marcadores celulares, por ejemplo, CD3, CD4, CD8, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD19, CD45RA, CD45RO, CD61 y CD66b.

10 En modalidades particulares, después de que se aíslan las PBMC, se someten a una o más etapas de lavado, por ejemplo, para eliminar el Ficoll. En ciertas modalidades, las células se pueden lavar una o más veces antes, durante o después de cualquier número de etapas de producción contempladas en el presente documento. El lavado puede realizarse en cualquier tampón o medio de cultivo adecuado, por ejemplo, tampón CliniMACS suplementado con HABS o HSA, PlasmaLyte, TCGM, PBS, solución de Ringer, solución salina fisiológica, NaCl al 0,9 % u otra solución adecuada que carezca de calcio, magnesio y la mayor parte de, o todos los demás, cationes divalentes, o cualquier medio de cultivo adecuado, o cualquier combinación adecuada de estos. En una modalidad, después de aislar las PBMC, se lavan en una centrífuga de flujo semiautomatizada, por ejemplo, el procesador de células Cobe 2991, el Cell Saver 5, el Baxter CytoMate, LOVO o similares. En otra modalidad, después de que se aíslan las PBMC, se transfieren a otro recipiente estéril, por ejemplo, un recipiente de transferencia o cultivo. Como se usa en el presente documento, el término "recipiente" se refiere generalmente a cualquier envase que pueda usarse con fines de cultivo, manejo, manipulación, almacenamiento, análisis, incubación, administración y de otro modo establecimiento, apoyo, cultivo, cosecha, tratamiento y uso de células y subproductos de estos *ex vivo* o *in vitro* o de otro modo para una variedad de propósitos como se establece y se contempla en este documento.

25 Los "recipientes de transferencia" generalmente se refieren a recipientes que no son permeables a los gases. En una modalidad, los lavados se realizan en recipientes de transferencia y la posterior manipulación celular se realiza en uno o más tipos de recipientes de cultivo celular.

30 Los ejemplos ilustrativos de recipientes de cultivo celular incluyen, sin limitación, bolsas de cultivo celular, biorreactores (por ejemplo, Biorreactor de matraz de expansión rápida permeable a los gases (G-Rex), Producción de Wilson-Wolf y biorreactores WAVE, GE Healthcare Life Sciences), dispositivos de cultivo de células o tejidos, bolsas, cápsulas, frascos de cultivo, aparatos, fábricas celulares, envases, tubos de cultivo (por ejemplo, tubos de microcentrífuga, EPPENDORF TUBES®, tubos cónicos FALCON®, etc.), placas de cultivo (por ejemplo, placas de Petri), matraces de cultivo, matraces giratorios, botellas giratorias, placas de múltiples pocillos (por ejemplo, placas de 2 pocillos, 4 pocillos, 6 pocillos, 12 pocillos, 24 pocillos, 48 pocillos, 96 pocillos y 384 pocillos), microincubadoras, microportadores, microplacas, portaobjetos y portaobjetos con cámara.

En otra modalidad más, las PBMC pueden lavarse una o más veces en una centrífuga de flujo semiautomatizada y transferirse y lavarse una o más veces en un recipiente adecuado.

40 Las modalidades ilustrativas de las bolsas de cultivo celular incluyen, sin limitación, bolsas de expansión celular GMP MACS®, bolsas de diferenciación celular GMP MACS®, biocontenedores de expansión celular EXP-Pak™, bolsas VueLife™, bolsas KryoSure™, bolsas KryoVue™, bolsas Lifecell®, bolsas PermaLife™, bolsas X-Fold™, bolsas Si-Culture™, bolsas criogénicas biomédicas Origen y bolsas VectraCell™. En modalidades particulares, las bolsas de cultivo celular comprenden una o más de las siguientes características: permeabilidad a los gases (los materiales tienen velocidades de transferencia de gases adecuadas para oxígeno, dióxido de carbono y nitrógeno); tasas de pérdida de agua insignificantes (los materiales son prácticamente impermeables al agua); química y biológicamente inerte (los materiales no reaccionan con el contenido del recipiente), y retención de flexibilidad y resistencia en diversas condiciones (los materiales permiten que el recipiente sea sometido a microondas, tratado con radiación UV, centrifugado o utilizado dentro de un amplio rango de temperaturas, por ejemplo, de -100 °C a + 100 °C).

55 Los volúmenes ilustrativos del recipiente de cultivo celular contemplado en el presente documento incluyen, sin limitación, volúmenes de aproximadamente 10 ml, aproximadamente 25 ml, aproximadamente 50 ml, aproximadamente 75 ml, aproximadamente 100 ml, aproximadamente 150 ml, aproximadamente 250 ml, aproximadamente 500 ml, aproximadamente 750 ml, aproximadamente 1000 ml, aproximadamente 1250 ml, aproximadamente 1500 ml, aproximadamente 1750 ml, aproximadamente 2000 ml o más, incluido cualquier volumen intermedio. Por ejemplo, los volúmenes intermedios entre 10 ml y 25 ml incluyen 11 ml, 12 ml, 13 ml, 14 ml, 15 ml, 16 ml, 17 ml, 18 ml, 19 ml, 20 ml, 21 ml, 22 ml, 23 ml y 24 ml. En una modalidad, el volumen del recipiente de cultivo celular es de aproximadamente 100 ml a aproximadamente 10 L.

60 Después del lavado de las células aisladas, se pueden determinar el conteo y la viabilidad de las células después del lavado, se pueden criopreservar para uso o análisis futuros, y/o se pueden caracterizar mediante el uso de análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), mediante el uso de una serie de marcadores celulares, por ejemplo, CD3, CD4, CD8, CD27, CD28, CD45RA, CD45RO, CD62L, CD127, CD197, CD279 y HLA-DR.

#### 65 4. Criopreservación

En modalidades particulares, los métodos de producción de células T contemplados en el presente documento se llevan a la práctica mediante el uso de poblaciones de células recién aisladas que comprenden células T. En otras modalidades particulares, los métodos contemplados en el presente documento se llevan a la práctica mediante el uso de poblaciones criopreservadas de células que comprenden células T. Las células pueden criopreservarse después de la cosecha o el aislamiento de PBMC, después del inicio y la activación del cultivo, después de la transducción, o después de la expansión o después de cualquier etapa del proceso. Las composiciones de células T producidas también se pueden criopreservar siguiendo el proceso de producción de células T. El ciclo de congelación-descongelación puede proporcionar una composición de células T más uniforme al eliminar las poblaciones de células que no son T.

Las poblaciones de células pueden criopreservarse en un recipiente de cultivo celular adecuado como se contempla en este documento, véase más arriba, en la sección de aislamiento de PBMC y en otro lugar del presente documento. Las poblaciones celulares pueden congelarse en un medio de cultivo celular adecuado y/o medio de congelación, por ejemplo, 50 % de plasmalyte y 50 % de Cryostor 10; 50/40/10 (XVIVO/HABS/DMSO); Cryostor 10; PBS que contiene 20 % de DMSO y 8 % de albúmina sérica humana, o medios de cultivo que contienen 10 % de dextrano 40 y 5 % de dextrosa, 20 % de albúmina sérica humana y 7,5 % de DMSO, o 31,25 % de Plasmalyte-A, 31,25 % de dextrosa 5 %, 0,45 % de NaCl, 10 % de dextrano 40 y 5 % de dextrosa, 20 % de albúmina de suero humano y 7,5 % de DMSO u otros medios de congelación celular adecuados que contienen, por ejemplo, Hespan y PlasmaLyte A. Después las células se congelan a una temperatura de aproximadamente -80 °C a aproximadamente -135 °C a una velocidad de 1° por minuto en un congelador de velocidad controlada y se almacenan en la fase de vapor de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido. Se pueden usar otros métodos ilustrativos de congelación controlada, así como la congelación no controlada inmediatamente a -20 °C o en nitrógeno líquido.

Después de la criopreservación, las células se descongelan en un baño de agua a 37 °C y se lavan en un medio de cultivo celular o tampón adecuado, por ejemplo, TCGM. Las células descongeladas pueden usarse posteriormente, ya sea para los métodos de producción contemplados en el presente documento o para la administración a un sujeto. Las etapas de lavado se pueden realizar como se contempla en otra parte del presente documento.

En ciertos ejemplos, las poblaciones de células que comprenden células T se aíslan de un individuo y se activan y estimulan para que proliferen *in vitro* sin más manipulación *ex vivo* o *in vitro*. Después dichas células pueden volverse a administrar directamente al individuo. En otros ejemplos, después de que se ha aislado una población de células que comprende células T, las células se activan primero y se estimulan para que proliferen *in vitro* antes de ser modificadas genéticamente para expresar un CAR o TCR modificado. A este respecto, las células T pueden cultivarse antes y/o después de ser modificadas genéticamente (es decir, transducidas o transfectadas para expresar un CAR o TCR modificado contemplado en el presente documento).

#### 5. Iniciación y activación del cultivo

Para lograr dosis terapéuticas suficientes de composiciones de células T, los métodos existentes para producir células T a menudo están sujetos a una o más rondas de estimulación, activación y/o expansión, lo que introduce más oportunidades de contaminación, aumenta el gasto y el tiempo del proceso de producción, y generalmente resultan en un producto de terapia celular inferior.

Los métodos de producción de células T contemplados en la presente descripción comprenden etapas de iniciación y activación de cultivo simples y robustas que contribuyen a obtener una composición de células T que es un producto terapéutico superior. En una modalidad, el inicio y la activación del cultivo comprende sembrar poblaciones de células en un recipiente de cultivo celular, por ejemplo, bolsa de cultivo celular, biorreactor GREX, biorreactor WAVE, etc. y activar las células T a través de rutas de señalización de células T primarias y coestimuladoras. Las composiciones celulares pueden cultivarse adicionalmente en presencia de uno o más factores de crecimiento o citocinas adicionales, por ejemplo, IL-2, IL7 y/o IL-15, o cualquier combinación adecuada de estos.

En ejemplos particulares, el inicio del cultivo comprende sembrar una población de células que comprende células T, por ejemplo, PBMC, en un recipiente de cultivo celular, a una densidad deseada, por ejemplo, 1-5 x 10<sup>6</sup> células/ml en un medio de cultivo celular adecuado que contiene una o más citocinas, ligandos estimuladores primarios y ligandos coestimuladores. En otra modalidad, las citocinas, ligandos estimuladores y coestimuladores pueden añadirse posteriormente a las PBMC en el medio de cultivo celular.

En una modalidad, el recipiente de cultivo celular es una bolsa de cultivo celular, que incluye sin limitación bolsas de expansión celular GMP MACS®, bolsas de diferenciación celular GMP MACS®, biocontenedores de expansión celular EXP-Pak™, bolsas Vuelife™, bolsas KryoSure™, Bolsas KryoVue™, bolsas Lifecell®, bolsas PermaLife™, bolsas X-Fold™, bolsas Si-Culture™ y bolsas Vectra-Cell™, como se contempla en otra parte del presente documento.

En modalidades particulares, el recipiente de cultivo celular se siembra con un total de aproximadamente 1 x 10<sup>9</sup> células, aproximadamente 5 x 10<sup>8</sup> células, aproximadamente 1 x 10<sup>8</sup> células, aproximadamente 5 x 10<sup>7</sup> células, aproximadamente 1 x 10<sup>7</sup> células, aproximadamente 5 x 10<sup>6</sup> células, o aproximadamente 1 x 10<sup>6</sup> células, o cualquier

## ES 2 800 906 T3

cantidad intermedia de células. En modalidades particulares, las PBMC se siembran en un total de aproximadamente  $1 \times 10^8$  células.

5 En ciertos ejemplos, las poblaciones celulares, por ejemplo, PBMC, se siembran en el recipiente de cultivo celular a una densidad de aproximadamente  $1 \times 10^7$  células/ml, aproximadamente  $9 \times 10^6$  células/ml, aproximadamente  $8 \times 10^6$  células/ml, aproximadamente  $7 \times 10^6$  células/ml, aproximadamente  $6 \times 10^6$  células/ml, aproximadamente  $5 \times 10^6$  células/ml, aproximadamente  $4 \times 10^6$  células/ml, aproximadamente  $3 \times 10^6$  células/ml, aproximadamente  $2 \times 10^6$  células/ml, aproximadamente  $1 \times 10^6$  células/ml, aproximadamente  $9 \times 10^5$  células/ml, aproximadamente  $8 \times 10^5$  células/ml, aproximadamente  $7 \times 10^5$  células/ml, aproximadamente  $6 \times 10^5$  células/ml, aproximadamente  $5 \times 10^5$  células/ml, aproximadamente  $4 \times 10^5$  células/ml, aproximadamente  $3 \times 10^5$  células/ml, aproximadamente  $2 \times 10^5$  células/ml, o aproximadamente  $1 \times 10^5$  células/ml, o cualquier densidad intermedia de células. En modalidades particulares, las PBMC se siembran a una densidad de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células/ml.

15 En modalidades particulares, las células se siembran en un recipiente de cultivo celular que comprende un medio de cultivo celular adecuado. Los ejemplos ilustrativos de medios de cultivo celular adecuados incluyen, sin limitación, medio de cultivo de células T (TCGM; X-VIVO™ 15 suplementado con GlutaMAX™-I 2 mM, HEPES 10 mM y suero AB humano al 5 %), CTS™ OpTmizer™ T Cell Expansion SFM (Life Technologies), medio CTS™ AIM V® (Life Technologies), RPMI 1640, Clicks, DMEM, MEM, a-MEM, F-12, X-Vivo 15 (Lonza), medio libre de suero CellGro® (CellGenix) y X-Vivo 20 (Lonza) con adición de aminoácidos, piruvato de sodio y vitaminas, libres de suero o suplementados con una cantidad apropiada de suero (o plasma) o un conjunto definido de hormonas, y/o una cantidad de citocina(s) suficiente para el crecimiento y la expansión de las células T. En una modalidad particular, el medio de cultivo celular es TCGM.

25 En las modalidades, los medios de cultivo celular contemplados en el presente documento comprenden interleucina-2 (IL-2). Los medios de cultivo celular contemplados en el presente documento pueden comprender además uno o más factores que incluyen, sin limitación, suero (por ejemplo, suero fetal bovino o humano), insulina, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-7, IL-21, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF $\beta$  y TNF- $\alpha$ .

30 En una modalidad, el medio de cultivo celular puede comprender además una o más citocinas, por ejemplo, tales como IL-7 y/o IL-15, o cualquier combinación adecuada de estas. Ejemplos ilustrativos de concentraciones adecuadas de cada citocina o la concentración total de citocinas incluyen aproximadamente 25 UI/ml, aproximadamente 50 UI/ml, aproximadamente 75 UI/ml, aproximadamente 100 UI/ml, aproximadamente 125 UI/ml, aproximadamente 150 UI/ml, aproximadamente 175 UI/ml, aproximadamente 200 UI/ml, aproximadamente 250 UI/ml, aproximadamente 300 UI/ml, aproximadamente 350 UI/ml, aproximadamente 400 UI/ml, aproximadamente 450 UI/ml o aproximadamente 500 UI/ml o cualquier cantidad intermedia de citocina de estas. En modalidades particulares, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 100 UI/ml de cada una, o en total, de IL-2, IL-1 y/o IL-15, o cualquier combinación de estas.

40 En modalidades particulares, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 250 UI/ml de cada una, o en total, de IL-2, IL-1 y/o IL-15, o cualquier combinación de estas.

45 En ejemplos particulares, las PBMC o las células T aisladas se ponen en contacto con uno o más agentes estimuladores y agentes coestimuladores, como los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, y una o más citocinas, como IL-2, IL-7 y/o IL-15.

La activación de las células T se puede lograr al proporcionar una señal de estimulación primaria a través del complejo TCR/CD3 de las células T o mediante la estimulación de la proteína de superficie CD2 y al proporcionar una señal de coestimulación secundaria a través de una molécula accesoria, por ejemplo, CD28 o 4-1BBL.

50 El complejo TCR/CD3 puede estimularse al poner en contacto la célula T con un agente de unión a CD3 adecuado, por ejemplo, un ligando de CD3 o un anticuerpo monoclonal anti-CD3. Los ejemplos ilustrativos de anticuerpos CD3 incluyen, sin limitación, OKT3, G19-4, BC3 y 64.1. También se pueden usar otros anticuerpos que se unen a los mismos epítopos que cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente. Se pueden preparar e identificar anticuerpos adicionales, o combinaciones de anticuerpos, mediante técnicas estándar como se describe en otra parte de este documento. En una modalidad, el anticuerpo anti-CD3 es OKT3.

55 En otro ejemplo, se puede usar un agente de unión a CD2 para proporcionar una señal de estimulación primaria a las células T. Los ejemplos ilustrativos de agentes de unión a CD2 incluyen, sin limitación, ligandos de CD2 y anticuerpos anti-CD2, por ejemplo, el anticuerpo T11.3 en combinación con el anticuerpo T11.1 o T11.2 (Meuer, S.C. y otros (1984) Cell 36: 897-906) y el anticuerpo 9.6 (que reconoce el mismo epítipo que TI 1.1) en combinación con el anticuerpo 9-1 (Yang, S.Y. y otros (1986) J. Immunol. 137: 1097-1100).

65 Además de la señal de estimulación primaria proporcionada a través del complejo TCR/CD3, o mediante CD2, la inducción de respuestas de células T requiere una segunda señal coestimuladora. En ejemplos particulares, se puede usar un agente de unión a CD28 para proporcionar una señal coestimuladora. Los ligandos coestimuladores adecuados incluyen, sin limitación, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L 1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, ligando

coestimulador inducible (ICOS-L), molécula de adhesión intercelular (ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, receptor beta de linfotoxina, ILT3, ILT4, un agonista o anticuerpo que se une al receptor del ligando Toll y un ligando que se une específicamente con B7-H3.

5 En un ejemplo particular, un ligando coestimulador comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este que se une específicamente a una molécula coestimuladora presente en una célula T, que incluye, sin limitación, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, 1COS, antígeno 1 asociado a la función linfocítica (LFA-1), CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 y un ligando que se une específicamente con CD83.

10 Los ejemplos ilustrativos de agentes de unión a CD28 incluyen, sin limitación: ligandos naturales de CD 28, por ejemplo, un ligando natural para CD28 (por ejemplo, un miembro de la familia de proteínas B7, como B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86); y un anticuerpo monoclonal anti-CD28 o fragmento de este que puede unirse a la molécula CD28, por ejemplo, anticuerpos monoclonales 9.3, B-T3, XR-CD28, KOLT-2, 15E8, 248.23.2 y EX5.3D10. En una modalidad, el anticuerpo anti-CD28 es 15E8.

15 En una modalidad, la molécula que proporciona la señal de estimulación primaria y la molécula coestimuladora están acopladas a la misma superficie.

20 En ciertas modalidades, los agentes de unión que proporcionan señales estimuladoras y coestimuladoras se localizan en la superficie de una célula. Esto se puede lograr al transfectar o transducir una célula con un ácido nucleico que codifica el agente de unión en una forma adecuada para su expresión en la superficie celular o, alternativamente, acoplar un agente de unión a la superficie celular.

25 En otra modalidad, la molécula que proporciona la señal de estimulación primaria y la molécula coestimuladora se muestran en las células presentadoras de antígeno.

En una modalidad, la molécula que proporciona la señal de estimulación primaria y la molécula coestimuladora se proporcionan en superficies separadas.

30 En una determinada modalidad, uno de los agentes de unión que proporcionan señales estimuladoras y coestimuladoras es soluble (proporcionado en solución) y el (los) otro(s) agente(s) se proporciona(n) en una o más superficies.

35 En una modalidad particular, los agentes de unión que proporcionan señales estimuladoras y coestimuladoras se proporcionan en forma soluble (en solución).

En diversas modalidades, los métodos para producir células T contemplados en el presente documento comprenden activar células T al poner en contacto las células T con anticuerpos solubles anti-CD3 y anti-CD28.

40 En modalidades particulares, el medio de cultivo celular para activar células T comprende una concentración de anticuerpo anti-CD3 o agente de unión a CD3 de aproximadamente 10 ng/ml, aproximadamente 20 ng/ml, aproximadamente 30 ng/ml, aproximadamente 40 ng/ml, aproximadamente 50 ng/ml, aproximadamente 60 ng/ml, aproximadamente 70 ng/ml, aproximadamente 80 ng/ml, aproximadamente 90 ng/ml, aproximadamente 100 ng/ml, o aproximadamente 200 ng/ml, o cualquier concentración intermedia.

45 En ciertas modalidades, el medio de cultivo celular para activar las células T comprende una concentración de anticuerpo anti-CD28 o agente de unión a CD28 de aproximadamente 10 ng/ml, aproximadamente 20 ng/ml, aproximadamente 30 ng/ml, aproximadamente 40 ng/ml, aproximadamente 50 ng/ml, aproximadamente 60 ng/ml, aproximadamente 70 ng/ml, aproximadamente 80 ng/ml, aproximadamente 90 ng/ml, aproximadamente 100 ng/ml, o aproximadamente 200 ng/ml, o cualquier concentración intermedia.

50 En diversas modalidades, el medio de cultivo celular para activar las células T comprende aproximadamente anticuerpo anti-CD3 a 50 ng/ml y anticuerpo anti-CD28 a 50 ng/ml.

55 Las poblaciones de células sembradas en el recipiente de cultivo celular se activan durante al menos 30 minutos, al menos 1 hora, al menos 2 horas, al menos 3 horas, al menos 4 horas, al menos 5 horas, al menos 6 horas, al menos 7 horas, al menos 9 horas, al menos 10 horas, al menos 11 horas, al menos 12 horas, al menos 13 horas, al menos 14 horas, al menos 15 horas, al menos 16 horas, al menos 17 horas, al menos 18 horas, al menos 19 horas, al menos 20 horas, al menos 21 horas, al menos 22 horas, al menos 23 horas, o al menos 24 horas, o cualquier período de tiempo intermedio.

60 En ciertas modalidades, las células se cosechan, se aíslan y se lavan, se inician los cultivos celulares y las células T se activan todas dentro de un período de aproximadamente 18 horas a aproximadamente 36 horas, o dentro de un período de aproximadamente 24 horas, o cualquier período de tiempo intermedio de estos.

65

## 6. Transducción

Los métodos de producción de células T contemplados en el presente documento comprenden modificar las células efectoras inmunitarias y/o las células T para expresar un receptor de células T (TCR) modificado o un receptor de antígeno quimérico (CAR). En un ejemplo particular, una población de células que comprende células T se activa, se modifica para expresar un CAR o TCR modificado, y después se cultiva para su expansión. Las etapas pueden tener lugar en el mismo recipiente de cultivo celular o en diferentes recipientes. "Transducción" se refiere al suministro de uno o más genes u otra secuencia de polinucleótidos, por ejemplo, un CAR o TCR modificado a las células efectoras inmunitarias, incluidas las células T, mediante el uso de un vector retroviral o lentiviral por medio de una infección viral. En un ejemplo, los vectores retrovirales se transducen a una célula a través de la infección y la integración de provirus. En ciertas modalidades, una célula objetivo, por ejemplo, una PBMC o una célula T, se "transduce" si comprende un gen u otra secuencia de polinucleótidos suministrada a la célula mediante infección con el uso de un vector lentiviral. En ejemplos particulares, una célula transducida comprende uno o más genes u otras secuencias polinucleotídicas suministradas por un vector retroviral o lentiviral en su genoma celular.

La producción de partículas virales infecciosas y soluciones madre virales se puede llevar a cabo mediante el uso de técnicas convencionales. Los métodos para preparar soluciones madre virales son conocidos en la técnica y se ilustran, por ejemplo, en Y. Soneoka y otros (1995) Nucl. Acids Res. 23:628-633, y N.R. Landau y otros (1992) J. Virol. 66:5110-5113. Mediante técnicas conocidas se pueden generar virus recombinantes con títulos de varios millones de unidades de transducción por mililitro (TU/ml). Después de la ultracentrifugación, se pueden obtener reservas concentradas de aproximadamente  $10^8$  TU/ml,  $10^9$  TU/ml,  $10^{10}$  TU/ml,  $10^{11}$  TU/ml o  $10^{12}$  TU/ml, o se puede obtener cualquier título intermedio.

Los virus pueden administrarse de acuerdo con el título viral (TU/ml), que puede medirse, por ejemplo, mediante el uso de un ensayo de título para p24 disponible comercialmente, que es un ELISA contra la proteína de la cubierta viral p24. La siguiente fórmula se puede usar para calcular el pg/ml de p24: hay aproximadamente 2000 moléculas de p24 por partícula física (PP) de lentivirus:  $(2 \times 10^3) \times (24 \times 10^3 \text{ Da de p24 por PP}) / (48 \times 10^6 / \text{Avogadro}) = (48 \times 10^6) / (6 \times 10^{23}) = 8 \times 10^{-17} \text{ g de p24 por PP}$ , aproximadamente 1 PP por  $1 \times 10^{-16} \text{ g de p24}$ ,  $1 \times 10^4 \text{ PP por pg de p24}$ . Un vector lentiviral pseudotipado VSV-G razonablemente bien empaquetado tendrá un índice de infectividad en el rango de 1 TU por 1000 partículas físicas (PP) a 1 TU por 100 PP (o menos). Por lo tanto, el rango es de aproximadamente 10 a 100 TU/pg de p24. Es a través de esta conversión que se obtiene TU/ml.

Los títulos infecciosos también pueden determinarse mediante análisis de células de osteosarcoma humano transducido (HOS) (Kutner y otros, 2009, Nature Protocols 4: 495-505). Brevemente, las células HOS transducidas se cultivan durante siete días en DMEM suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 %, después de lo cual se extrae el ADN genómico mediante DNeasy (Qiagen, Venlo Netherlands, Catálogo # 69506) y se evalúa mediante PCR cuantitativa (qPCR). Los conjuntos de cebadores/sondas del protocolo de qPCR miden el número de copias del vector (VCN) de las células transducidas al determinar el número de copias de la región psi-gag lentiviral por número de copias endógenas de RNAsp humana. La integridad del provirus se evaluó mediante la secuenciación de inserciones provirales individuales.

En un ejemplo, el título viral se determina mediante el uso de un ensayo con la línea celular HOS.

En ejemplos particulares, una población de células que comprende células T activadas se transduce en un recipiente de cultivo celular aproximadamente en el momento de la activación, aproximadamente 1 hora después de la activación, aproximadamente 2 horas después de la activación, aproximadamente 3 horas después de la activación, aproximadamente 4 horas después de la activación, aproximadamente 5 horas después de la activación, aproximadamente 6 horas después de la activación, aproximadamente 7 horas después de la activación, aproximadamente 8 horas después de la activación, aproximadamente 9 horas después de la activación, aproximadamente 10 horas después de la activación, aproximadamente 11 horas después de la activación, aproximadamente 12 horas después de la activación, aproximadamente 13 horas después de la activación, aproximadamente 14 horas después de la activación, aproximadamente 15 horas después de la activación, aproximadamente 16 horas después de la activación, aproximadamente 17 horas después de la activación, aproximadamente 18 horas después de la activación, aproximadamente 19 horas después de la activación, aproximadamente 20 horas después de la activación, aproximadamente 21 horas después de la activación, aproximadamente 22 horas después de la activación, aproximadamente 23 horas después de la activación, aproximadamente 24 horas después de la activación, aproximadamente 25 horas después de la activación, aproximadamente 26 horas después de la activación, aproximadamente 27 horas después de la activación, aproximadamente 28 horas después de la activación, aproximadamente 29 horas después de la activación, o aproximadamente 30 horas después de la activación o cualquier período de tiempo intermedio después de la activación.

En una modalidad, la población de células se transduce de aproximadamente 20 a aproximadamente 24 horas después de la activación.

Los métodos de producción contemplados en el presente documento comprenden transducir PBMC que comprenden células T activadas en un recipiente de cultivo celular con un vector de aproximadamente  $1 \times 10^8$  a aproximadamente

1 x 10<sup>10</sup> TU/10<sup>8</sup> PBMC, aproximadamente 5 x 10<sup>8</sup> a aproximadamente 5 x 10<sup>9</sup> TU/10<sup>8</sup> PBMC, aproximadamente 1 x 10<sup>9</sup> a aproximadamente 5 x 10<sup>9</sup> TU/10<sup>8</sup> PBMC, aproximadamente 1 x 10<sup>9</sup> a aproximadamente 4 x 10<sup>9</sup> TU/10<sup>8</sup> PBMC, aproximadamente 1 x 10<sup>9</sup> a aproximadamente 3 x 10<sup>9</sup> TU/10<sup>8</sup> PBMC, aproximadamente 1 x 10<sup>9</sup> a aproximadamente 2 x 10<sup>9</sup> TU/10<sup>8</sup> PBMC, o cualquier TU intermedia.

5 En una modalidad, los métodos de producción contemplados en el presente documento comprenden transducir PBMC que comprenden células T activadas en un recipiente de cultivo celular con un vector de aproximadamente 1 x 10<sup>8</sup> TU/10<sup>8</sup> PBMC, aproximadamente 5 x 10<sup>8</sup> TU/10<sup>8</sup> PBMC, aproximadamente 6 x 10<sup>8</sup> TU/10<sup>8</sup> PBMC, aproximadamente 7 x 10<sup>8</sup> TU/10<sup>8</sup> PBMC, aproximadamente 8 x 10<sup>8</sup> TU/10<sup>8</sup> PBMC, aproximadamente 9 x 10<sup>8</sup> TU/10<sup>8</sup> PBMC, aproximadamente 1 x 10<sup>9</sup> TU/10<sup>8</sup> PBMC, aproximadamente 2 x 10<sup>9</sup> TU/10<sup>8</sup> PBMC, aproximadamente 3 x 10<sup>9</sup> TU/10<sup>8</sup> PBMC, aproximadamente 4 x 10<sup>9</sup> TU/10<sup>8</sup> PBMC, aproximadamente 5 x 10<sup>9</sup> TU/10<sup>8</sup> PBMC, aproximadamente 6 x 10<sup>9</sup> TU/10<sup>8</sup> PBMC, aproximadamente 7 x 10<sup>9</sup> TU/10<sup>8</sup> PBMC, aproximadamente 8 x 10<sup>9</sup> TU/10<sup>8</sup> PBMC, aproximadamente 9 x 10<sup>9</sup> TU/10<sup>8</sup> PBMC, o aproximadamente 1 x 10<sup>10</sup> TU/10<sup>8</sup> PBMC, o cualquier TU intermedia.

15 En una modalidad particular, las células se transducen con un vector de aproximadamente 1 x 10<sup>7</sup> a aproximadamente 2 x 10<sup>9</sup> TU/10<sup>8</sup> PBMC.

20 En una modalidad, los métodos de producción contemplados en el presente documento comprenden transducir PBMC que comprenden células T activadas en un recipiente de cultivo celular con un vector a una MOI de aproximadamente 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100, o cualquier número entero intermedio. En una modalidad, las PBMC se transducen con un vector a una MOI de aproximadamente 20.

25 En ciertas modalidades, el vector puede diluirse en medio de cultivo celular hasta aproximadamente el 10 % del volumen de cultivo celular, aproximadamente el 15 % del volumen de cultivo celular, aproximadamente el 16 % del volumen de cultivo celular, aproximadamente el 17 % del volumen de cultivo celular, aproximadamente el 18 % del volumen de cultivo celular, aproximadamente el 19 % del volumen de cultivo celular, aproximadamente el 20 % del volumen de cultivo celular, aproximadamente el 21 % del volumen de cultivo celular, aproximadamente el 22 % del volumen de cultivo celular, aproximadamente el 23 % del volumen de cultivo celular, aproximadamente el 24 % del volumen de cultivo celular, aproximadamente el 25 % del volumen de cultivo celular, aproximadamente el 30 % del volumen de cultivo celular, aproximadamente el 35 % del volumen de cultivo celular, aproximadamente el 40 % del volumen de cultivo celular, aproximadamente el 45 % del volumen de cultivo celular, o aproximadamente el 50 % del volumen de cultivo celular, o cualquier porcentaje intermedio de estos.

35 En una modalidad particular, el vector se diluye en medio de cultivo celular, por ejemplo, TCGM, hasta aproximadamente el 20 % del volumen de cultivo celular.

40 Las poblaciones de células sembradas en el recipiente de cultivo celular se transducen durante aproximadamente 6 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 30 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 42 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 54 horas, o aproximadamente 60 horas, o cualquier período de tiempo intermedio.

En una modalidad particular, las células se transducen durante aproximadamente 48 horas.

45 Después de que las células se transducen, pueden someterse a una o más etapas de lavado como se contempla en el presente documento y posteriormente se siembran en un recipiente de cultivo celular adecuado para su expansión.

## 7. Expansión

50 Las plataformas de producción de células T contempladas en el presente documento pueden comprender una o más rondas de expansión de células T. En modalidades particulares, las poblaciones de células que comprenden células T que se han activado y/o transducido se siembran en recipientes de cultivo celular adecuados que comprenden medio de cultivo celular adecuado para su expansión. En modalidades particulares, las células se siembran en un biorreactor y se cosechan periódicamente sin volver a sembrar.

55 En ciertas modalidades, las células se vuelven a sembrar a una densidad para mantener el crecimiento en fase logarítmica de las células.

60 En modalidades particulares, las células se siembran en el cultivo celular a una densidad de aproximadamente 0,1 x 10<sup>6</sup> a aproximadamente 1 x 10<sup>7</sup> células/ml, aproximadamente 0,1 x 10<sup>6</sup> a aproximadamente 0,9 x 10<sup>6</sup> células/ml, aproximadamente 0,1 x 10<sup>6</sup> a aproximadamente 0,8 x 10<sup>6</sup> células/ml, aproximadamente 0,1 x 10<sup>6</sup> a aproximadamente 0,7 x 10<sup>6</sup> células/ml, aproximadamente 0,1 x 10<sup>6</sup> a aproximadamente 0,6 x 10<sup>6</sup> células/ml, aproximadamente 0,1 x 10<sup>6</sup> a aproximadamente 0,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, aproximadamente 0,2 x 10<sup>6</sup> a aproximadamente 0,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, o aproximadamente 0,3 x 10<sup>6</sup> a aproximadamente 0,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, o cualquier densidad intermedia de células, siempre que las células permanezcan en crecimiento en fase logarítmica.

65

- 5 En ciertas modalidades, las células se siembran en el cultivo celular a una densidad de aproximadamente  $0,1 \times 10^6$  células/ml, aproximadamente  $0,2 \times 10^6$  células/ml, aproximadamente  $0,3 \times 10^6$  células/ml, aproximadamente  $0,4 \times 10^6$  células/ml, aproximadamente  $0,5 \times 10^6$  células/ml, aproximadamente  $0,6 \times 10^6$  células/ml, aproximadamente  $0,7 \times 10^6$  células/ml, aproximadamente  $0,8 \times 10^6$  células/ml, aproximadamente  $0,9 \times 10^6$  células/ml, o aproximadamente  $1 \times 10^7$  células/ml, o cualquier densidad intermedia de células, siempre que las células permanezcan en crecimiento en fase logarítmica.
- 10 En algunas modalidades, las células se siembran en un biorreactor, por ejemplo, biorreactor WAVE, a una densidad de aproximadamente  $0,1 \times 10^6$  células/ml, aproximadamente  $0,5 \times 10^6$  células/ml, aproximadamente  $1 \times 10^6$  células/ml, aproximadamente  $2 \times 10^6$  células/ml, aproximadamente  $3 \times 10^6$  células/ml, aproximadamente  $4 \times 10^6$  células/ml, aproximadamente  $5 \times 10^6$  células/ml, aproximadamente  $6 \times 10^6$  células/ml, aproximadamente  $7 \times 10^6$  células/ml, aproximadamente  $8 \times 10^6$  células/ml, aproximadamente  $9 \times 10^6$  células/ml, o aproximadamente  $1 \times 10^7$  células/ml o cualquier densidad intermedia de células, siempre que las células permanezcan en crecimiento en fase logarítmica.
- 15 En modalidades particulares, las células se siembran en un recipiente de cultivo celular que comprende un medio de cultivo celular adecuado para la expansión de células T. Los ejemplos ilustrativos de medios de cultivo celular adecuados para la expansión de células T incluyen, sin limitación, medio de cultivo de células T (TCGM), SFM de expansión de células T CTS™ OpTmizer™ (Life Technologies), medio CTS™ AIM V® (Life Technologies), RPMI 1640, Clicks, DMEM, MEM, a-MEM, F-12, X-Vivo 15 (Lonza) y X-Vivo 20 (Lonza) y/u hormonas adicionales, factores de crecimiento o citocina(s) suficientes para el crecimiento y la expansión de las células T. En una modalidad particular, el medio de cultivo celular es TCGM. En una determinada modalidad, el medio de cultivo celular comprende además uno o más factores que incluyen, sin limitación, suero (por ejemplo, suero fetal bovino o humano), interleucina-2 (IL-2), insulina, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-7, IL-21, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF $\beta$  y TNF- $\alpha$ , o cualquier combinación de estos.
- 20 En una modalidad, el medio de cultivo celular puede comprender una o más citocinas, por ejemplo, tales como IL-2, IL-7 y/o IL-15, o cualquier combinación adecuada de estas. Ejemplos ilustrativos de concentraciones adecuadas de cada citocina o la concentración total de citocinas incluyen aproximadamente 25 UI/ml, aproximadamente 50 UI/ml, aproximadamente 75 UI/ml, aproximadamente 100 UI/ml, aproximadamente 125 UI/ml, aproximadamente 150 UI/ml, aproximadamente 175 UI/ml, aproximadamente 200 UI/ml, aproximadamente 250 UI/ml, aproximadamente 300 UI/ml, aproximadamente 350 UI/ml, aproximadamente 400 UI/ml, aproximadamente 450 UI/ml o aproximadamente 500 UI/ml o cualquier cantidad intermedia de citocina de estas. En modalidades particulares, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 100 UI/ml de cada una, o en total, de IL-2, IL-1 y/o IL-15, o cualquier combinación de estas.
- 25 En modalidades particulares, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 250 UI/ml de cada una, o en total, de IL-2, IL-1 y/o IL-15, o cualquier combinación de estas.
- 30 En modalidades particulares, los métodos de producción de células T contemplados en el presente documento comprenden expandir las células T durante aproximadamente 3 días a aproximadamente 14 días, aproximadamente 3 días a aproximadamente 13 días, aproximadamente 3 días a aproximadamente 12 días, aproximadamente 3 días a aproximadamente 11 días, aproximadamente 3 días a aproximadamente 10 días, aproximadamente 3 días a aproximadamente 9 días, aproximadamente 3 días a aproximadamente 8 días, o aproximadamente 3 a aproximadamente 7 días, o aproximadamente 5 a aproximadamente 8 días o cualquier número intermedio de días. En ciertas modalidades, los métodos de producción de células T contemplados en el presente documento comprenden expandir células T durante aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 8 días, aproximadamente 9 días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 11 días, o aproximadamente 12 días. La expansión puede realizarse en el mismo recipiente y/o tipo de recipiente durante todo el período de expansión o en diferentes recipientes y/o tipos de recipientes durante el período de expansión.
- 35 En una modalidad, la expansión de células T se realiza durante aproximadamente 5 días a aproximadamente 8 días en una bolsa de cultivo celular.
- 40 En una modalidad, la expansión de células T se realiza durante aproximadamente 5 días a aproximadamente 8 días en una bolsa de cultivo celular y después la expansión continúa en un biorreactor, que incluye, sin limitación, un biorreactor WAVE o G-REX. En una modalidad particular, la expansión puede continuar en el biorreactor durante aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días o aproximadamente 5 días o más.
- 45 En otra modalidad, la expansión de células T se realiza durante aproximadamente 5 días a aproximadamente 8 días en un biorreactor, que incluye, sin limitación, un biorreactor WAVE o biorreactor G-REX.
- 50 El biorreactor WAVE permite tasas variables de oscilación y en una variedad de ángulos de oscilación diferentes. Las tasas de oscilación ilustrativas incluyen, sin limitación, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 oscilaciones por minuto. En ciertas modalidades, los métodos de estimulación y expansión de la presente invención
- 55
- 60
- 65

proporcionan un ajuste del ángulo de la plataforma oscilante de 1,5°, 2°, 2,5°, 3°, 3,5°, 4°, 4,5°, 5°, 5,5°, 6°, 6,5°, 7°, 7,5°, 8°, 8,5° o 9,0°.

5 En una modalidad, el volumen del biorreactor WAVE es de 2500 ml, la velocidad de oscilación es de aproximadamente 6 o aproximadamente 7 rpm y el ángulo está entre aproximadamente 7 y aproximadamente 8.

10 En una modalidad, las células se siembran inicialmente en aproximadamente 100 ml en un biorreactor GREX, y se añaden aproximadamente 200 ml de medio de cultivo fresco al cultivo en los días 3, 4 y 5. En ciertas modalidades, se añaden medios adicionales al biorreactor GREX para llevar el volumen de cultivo a aproximadamente 1 l el día 7.

15 Los conteos y la viabilidad de las células se verifican diariamente o en cualquier cantidad de días, las células o una porción de las células pueden criopreservarse, y/o las células pueden caracterizarse por análisis de FAC para la expresión de marcadores, por ejemplo, CD3, CD4, CD8, CD28, CD45RA, CD45RO, CD62L, CD127, CD27, CD197 y HLA-DR, transgén.

20 En una modalidad, una población de células T sometidas a los métodos de producción contemplados en el presente documento se expande al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 200 veces, al menos 300 veces, al menos 400 veces, al menos 500 veces, al menos 600 veces, al menos 700 veces, al menos 800 veces, al menos 900 veces o al menos 1000 veces o más, en comparación con la población inicial de células T.

#### 8. Recuperación de las composiciones de células T producidas

25 En modalidades particulares, los métodos para producir células T contemplados en el presente documento comprenden una etapa de recuperación de las composiciones de células T producidas que comprende cosechar y lavar las células expandidas mediante el uso de una centrífuga de flujo semiautomatizada, por ejemplo, el procesador de células Cobe 2991, el Cell Saver 5, el Baxter CytoMate, LOVO o similares.

30 Antes de cosechar las células expandidas, se pueden tomar alícuotas de muestra antes de la cosecha para establecer conteos celulares, viabilidad, caracterización celular, por ejemplo, análisis de FAC, pureza y/u otros criterios generales de liberación para las células. Además, se pueden tomar alícuotas de muestra posteriores a la cosecha para establecer conteos celulares y/o viabilidad.

35 Las composiciones de células T recuperadas se transfieren después a una o más bolsas IV u otros recipientes adecuados, por ejemplo, bolsas de expansión celular GMP MACS®, bolsas de diferenciación celular GMP MACS®, biocontenedores de expansión celular EXP-Pak™, bolsas VueLife™, bolsas KryoSure™, bolsas KryoVue™, bolsas Lifecell®, bolsas PermaLife™, bolsas X-Fold™, bolsas Si-Culture™, bolsas criogénicas biomédicas Origen y bolsas VectraCell™ y se criopreservan en un congelador de velocidad controlada como se mencionó anteriormente y en otros lugares, hasta que las células estén listas para su uso. En modalidades particulares, las células se congelan en 50 % de plasmalyte y 50 % de Cryostor 10; 50/40/10 (XVIVO/HABS/DMSO); o Cryostor 10.

40 Las bolsas (de 10 a 250 ml de capacidad) que contienen composiciones terapéuticas de células T se almacenan en condiciones de banco de sangre a una temperatura controlada de -80 °C a -135 °C. Las bolsas de infusión se almacenan en el congelador hasta que se necesiten.

#### 45 D. Receptores de células t modificados y receptores de antígeno quiméricos

50 Los métodos de producción de células T contemplados son particularmente útiles para expandir las células T modificadas para expresar receptores de células T de alta afinidad (TCR modificados) o receptores de antígeno quiméricos (CAR) de manera confiable y reproducible. En un ejemplo, la célula T se modifica genéticamente para expresar uno o más CAR o TCR modificados. Como se usa en el presente documento, las células T modificadas para expresar un CAR o TCR modificado que se contemplan en el presente documento pueden denominarse "células T redirigidas específicas de antígeno".

##### 55 1. TCR modificados

60 Los receptores de células T de origen natural comprenden dos subunidades, una subunidad  $\alpha$  y una subunidad  $\beta$ , cada una de las cuales es una proteína única producida por un evento de recombinación en el genoma de cada célula T. Las bibliotecas de TCR pueden seleccionarse por su selectividad a antígenos objetivo particulares. De esta manera, los TCR naturales, que tienen una gran avidéz y reactividad hacia los antígenos objetivo, pueden seleccionarse, clonarse y posteriormente introducirse en una población de células T utilizadas para inmunoterapia adoptiva.

65 En un ejemplo, las células T se modifican mediante la introducción de un polinucleótido que codifica una subunidad de un TCR que tiene la capacidad de formar TCR que confieren especificidad a las células T para las células tumorales que expresan un antígeno objetivo. En ejemplos particulares, las subunidades tienen una o más sustituciones, deleciones, inserciones o modificaciones de aminoácidos en comparación con la subunidad natural, siempre que las subunidades conserven la capacidad de formar TCR que confieran a las células T transfectadas la capacidad de dirigir

a las células objetivo, y participar en la señalización de citocinas de importancia inmunológica. Los TCR modificados también se unen preferentemente a las células objetivo que muestran el péptido asociado al tumor de interés con alta avidéz, y opcionalmente median la destrucción eficiente de las células objetivo que presentan el péptido de interés *in vivo*.

5 Los ácidos nucleicos que codifican los TCR modificados se aíslan preferentemente de su contexto natural en un cromosoma (natural) de una célula T, y se pueden incorporar en vectores adecuados como se describe en otra parte del presente documento. Tanto los ácidos nucleicos como los vectores que los comprenden pueden transferirse de manera útil a una célula, dicha célula es preferentemente una célula T. Las células T modificadas pueden entonces  
10 expresar ambas cadenas de un TCR codificado por el ácido nucleico o ácidos nucleicos transducidos. En ejemplos preferidos, el TCR modificado es un TCR exógeno porque se introduce en las células T que normalmente no expresan el TCR en particular. El aspecto esencial de los TCR modificados es que tiene una gran avidéz por un antígeno tumoral presentado por un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) o un componente inmunológico similar. A diferencia de los TCR modificados, los CAR están diseñados para unirse a los antígenos objetivo de manera independiente del  
15 MHC.

La proteína codificada por los ácidos nucleicos puede expresarse con polipéptidos adicionales unidos a la porción aminoterminal o carboxilo terminal de la cadena  $\alpha$  o la cadena  $\beta$  de un TCR siempre que el polipéptido adicional unido no interfiera con la capacidad de la cadena  $\alpha$  o la cadena  $\beta$  para formar un receptor de células T funcional y el reconocimiento del antígeno dependiente de MHC.  
20

Los antígenos que son reconocidos por los TCR modificados contemplados en el presente documento incluyen, sin limitación, antígenos de cáncer, incluidos antígenos tanto en cánceres hematológicos como en tumores sólidos. Los antígenos ilustrativos incluyen, sin limitación, receptor alfa de folato, 5T4, integrina  $\alpha_v\beta_6$ , BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, familia de EGFR que incluye ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetal, FR $\alpha$ , GD2, GD3, 'Glypican-3 (GPC3), HLA-A1 + MAGE1, HLA-A2 + MAGE1, HLA-A3 + MAGE1, HLA-A1 + NY-ESO-1, HLA-A2 + NY-ESO-1, HLA-A3 + NY-ESO-1, IL-11R $\alpha$ , IL-13R $\alpha_2$ , Lambda, Lewis-Y, Kappa, Mesotelina, Mucl, Muc16, NCAM, Ligandos de NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, Survivina, TAG72, TEM y VEGFR2.  
25  
30

## 2. Receptores de antígeno quiméricos (CAR)

Los métodos de producción de células T contemplados en el presente documento incluyen la modificación de células T para expresar uno o más CAR como se contempla en el presente documento. En varios ejemplos, la presente descripción proporciona células T genéticamente modificadas con vectores diseñados para expresar CAR que redirigen la citotoxicidad hacia las células tumorales. Los CAR son moléculas que combinan la especificidad basada en anticuerpos para un antígeno objetivo (por ejemplo, Antígeno tumoral) con un dominio intracelular que activa el receptor de células T para generar una proteína quimérica que exhibe una actividad inmunitaria celular antitumoral específica. Como se usa en el presente documento, el término "quimérico" describe estar compuesto de partes de diferentes proteínas o ADN de diferentes orígenes.  
35  
40

Los CAR contemplados en el presente documento comprenden un dominio extracelular que se une a un antígeno objetivo específico (también denominado dominio de unión o dominio de unión específico de antígeno), un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular. La característica principal de los CAR es su capacidad para redirigir la especificidad de las células efectoras inmunitarias, lo que desencadena la proliferación, la producción de citocinas, la fagocitosis o la producción de moléculas que pueden mediar la muerte celular de la célula que expresa el antígeno objetivo de manera independiente del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), explotando las capacidades de los anticuerpos monoclonales, ligandos solubles o correceptores específicos de células de lograr un direccionamiento específico a células.  
45  
50

En modalidades particulares, un CAR comprende un dominio de unión extracelular que incluye, sin limitación, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este, un ligando unido o el dominio extracelular de un correceptor, que se une específicamente a un antígeno objetivo que es un antígeno asociado a tumor (TAA) o un antígeno tumoral específico (TSA). En ciertas modalidades, el TAA o TSA se expresa en una célula cancerosa sanguínea. En otra modalidad, el TAA o TSA se expresa en una célula de un tumor sólido. En modalidades particulares, el tumor sólido es un glioblastoma, un cáncer de pulmón de células no pequeñas, un cáncer de pulmón distinto de un cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de colon, cáncer de estómago, un cáncer de bazo, cáncer de piel, un cáncer de cerebro que no sea un glioblastoma, un cáncer de riñón, un cáncer de tiroides o similares.  
55  
60

En modalidades particulares, el TAA o TSA se selecciona del grupo que consiste en receptor alfa de folato, 5T4, integrina  $\alpha_v\beta_6$ , BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, familia de EGFR que incluye ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetal, FR $\alpha$ , GD2, GD3, 'Glypican-3 (GPC3), HLA-A1 + MAGE1, HLA-A2 + MAGE1, HLA-A3 + MAGE1, HLA-A1 + NY-ESO-1, HLA-A2 + NY-ESO-1, HLA-A3 + NY-ESO-1, IL-11R $\alpha$ ,  
65

IL-13R $\alpha$ 2, Lambda, Lewis-Y, Kappa, Mesotelina, Mucl, Muc16, NCAM, Ligandos de NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, Survivina, TAG72, TEM y VEGFR2.

a. Dominio de unión

5 En modalidades particulares, los CAR contemplados en el presente documento comprenden un dominio de unión extracelular que se une específicamente a un polipéptido objetivo, por ejemplo, antígeno objetivo, expresado en células tumorales. Como se usa en el presente documento, los términos "dominio de unión", "dominio extracelular", "dominio de unión extracelular", "dominio de unión específico de antígeno" y "dominio de unión extracelular específico de antígeno" se usan indistintamente y proporcionan un CAR con la capacidad para unirse específicamente al antígeno objetivo de interés. Un dominio de unión puede comprender cualquier proteína, polipéptido, oligopéptido o péptido que posea la capacidad de reconocer específicamente y unirse a una molécula biológica (por ejemplo, un receptor de la superficie celular o proteína tumoral, lípido, polisacárido u otra molécula objetivo de la superficie celular, o componente de estos). Un dominio de unión incluye cualquier pareja de unión natural, sintética, semisintética o producida de manera recombinante, de una molécula biológica de interés.

En modalidades particulares, el dominio de unión extracelular de un CAR comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este. Un "anticuerpo" se refiere a un agente de unión que es un polipéptido que comprende al menos una región variable de inmunoglobulina de cadena ligera o cadena pesada que reconoce y se une específicamente a un epítipo de un antígeno objetivo, tal como un péptido, lípido, polisacárido o ácido nucleico que contiene un determinante antigénico, como los reconocidos por una célula inmunitaria. Los anticuerpos incluyen fragmentos de unión a antígeno de estos. El término también incluye formas genéticamente modificadas, tales como anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos murinos humanizados), anticuerpos heteroconjugados (como anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de unión a antígeno de estos. Ver además, Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., Immunology, 3ra Ed., WH Freeman & Co., Nueva York, 1997.

En modalidades particulares, el antígeno objetivo es un epítipo de un receptor alfa de folato, 5T4, integrina  $\alpha_v\beta_6$ , BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, familia de EGFR que incluye ErbB2 (HER2), EGFRVIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetal, FR $\alpha$ , GD2, GD3, 'Glypican-3 (GPC3), HLA-A1 + MAGE1, HLA-A2 + MAGE1, HLA-A3 + MAGE1, HLA-A1 + NY-ESO-1, HLA-A2 + NY-ESO-1, HLA-A3 + NY-ESO-1, IL-11R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$ 2, Lambda, Lewis-Y, Kappa, Mesotelina, Mucl, Muc16, NCAM, Ligandos de NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, Survivina, TAG72, TEM o polipéptido de VEGFR2.

Las regiones variables de cadena ligera y pesada contienen una región "marco" interrumpida por tres regiones hipervariables, también llamadas "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR". Las CDR se pueden definir o identificar por métodos convencionales, como por la secuencia de acuerdo con Kabat y otros (Wu, TT y Kabat, E.A., J Exp Med. 132 (2): 211-50, (1970); Borden, P. y Kabat E.A., PNAS, 84: 2440-2443 (1987); (ver Kabat y otros, Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, 1991), o por la estructura según Choithia y otros (Choithia, C. y Lesk, A.M., J Mol. Biol., 196 (4): 901-917 (1987), Choithia, C. y otros, Nature, 342: 877 - 883 (1989)).

Las secuencias de las regiones marco de diferentes cadenas ligeras o pesadas están relativamente conservadas dentro de una especie, como los seres humanos. La región marco de un anticuerpo, es decir, las regiones marco combinadas de las cadenas ligeras y pesadas constituyentes, sirve para posicionar y alinear las CDR en el espacio tridimensional. Las CDR son las principales responsables de la unión a un epítipo de un antígeno. Las CDR de cada cadena se denominan típicamente CDR1, CDR2 y CDR3, numeradas secuencialmente a partir del extremo N terminal, y también se identifican típicamente por la cadena en la que se encuentra la CDR particular. Por lo tanto, las CDR ubicadas en el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo se denominan CDRH1, CDRH2 y CDRH3, mientras que las CDR ubicadas en el dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo se denominan CDRL1, CDRL2, y CDRL3. Los anticuerpos con diferentes especificidades (es decir, diferentes sitios de combinación para diferentes antígenos) tienen diferentes CDR. Aunque son las CDR las que varían de un anticuerpo a otro, solo un número limitado de posiciones de aminoácidos dentro de las CDR están directamente involucradas en la unión al antígeno. Estas posiciones dentro de las CDR se denominan residuos determinantes de la especificidad (SDR).

Las referencias a "V<sub>H</sub>" o "VH" se refieren a la región variable de una cadena pesada de inmunoglobulina, que incluye la de un anticuerpo, Fv, scFv, dsFv, Fab u otro fragmento de anticuerpo como se describe en este documento. Las referencias a "V<sub>L</sub>" o "VL" se refieren a la región variable de una cadena ligera de inmunoglobulina, que incluye la de un anticuerpo, Fv, scFv, dsFv, Fab u otro fragmento de anticuerpo como se describe en este documento.

Un "anticuerpo monoclonal" es un anticuerpo producido por un solo clon de linfocitos B o por una célula en la que se han transfectado los genes de cadena ligera y pesada de un solo anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales se producen mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, mediante la producción de células híbridas formadoras de anticuerpos a partir de una fusión de células de mieloma con células inmunitarias del bazo. Los anticuerpos monoclonales incluyen anticuerpos monoclonales humanizados.

Un "anticuerpo quimérico" tiene residuos del marco de una especie, como la humana, y CDR (que generalmente confieren unión al antígeno) de otra especie, como un ratón. En modalidades preferidas particulares, un CAR contemplado en el presente documento comprende un dominio de unión específica a un antígeno que es un anticuerpo quimérico o un fragmento de unión a antígeno de este.

En ciertas modalidades preferidas, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado (tal como un anticuerpo monoclonal humanizado) que se une específicamente a una proteína de superficie en una célula tumoral. Un anticuerpo "humanizado" es una inmunoglobulina que incluye una región marco humana y una o más CDR de una inmunoglobulina no humana (por ejemplo, de ratón, rata o sintética). Los anticuerpos humanizados pueden construirse mediante ingeniería genética (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos núm. 5,585,089).

En modalidades particulares, el dominio de unión extracelular de un CAR comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este, que incluye, sin limitación, una Ig de camello (un anticuerpo de camélido (VHH)), Ig NAR, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab)'2, fragmentos F(ab)'3, Fv, anticuerpo Fv de cadena sencilla ("scFv"), bis-scFv, (scFv)'2, minicuerpo, diacuerpo, triacuerpo, tetracuerpo, proteína Fv estabilizada con disulfuro ("dsFv") y anticuerpo de dominio único (sdAb, Nanocuerpo).

"Ig de camello" o "VHH de camélido", como se usa en este documento, se refiere a la unidad de unión a antígeno más pequeña conocida de un anticuerpo de cadena pesada (Koch-Nolte, y otros, FASEB J., 21: 3490-3498 (2007)). Un "anticuerpo de cadenas pesadas" o un "anticuerpo de camélido" se refiere a un anticuerpo que contiene dos dominios VH y no contiene cadenas ligeras (Riechmann L. y otros, J. Immunol. Methods 231:25-38 (1999); documentos WO94/04678; WO94/25591; patente de Estados Unidos núm. 6,005,079).

"IgNAR", de las siglas en inglés de "nuevo receptor de antígeno de inmunoglobulina", se refiere a una clase de anticuerpos del repertorio inmunitario de tiburones que consiste en homodímeros de un dominio variable del nuevo receptor de antígeno (VNAR) y cinco dominios constantes del nuevo receptor de antígeno (CNAR).

La digestión de anticuerpos con papaína produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión al antígeno, y un fragmento residual "Fc", cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El fragmento Fab contiene los dominios variables de la cadena pesada y ligera y también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de algunos residuos en el terminal carboxilo del dominio CH1 de la cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para Fab' en la que el (los) residuo(s) de cisteína de los dominios constantes llevan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos F(ab)'2 originalmente se produjeron como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas de bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de unión al antígeno. En una especie de Fv de cadena sencilla (scFv), un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera se pueden unir covalentemente mediante un enlazador peptídico flexible de modo que las cadenas ligera y pesada se puedan asociar en una estructura "dimérica" análoga a la de una especie de Fv de dos cadenas.

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión al antígeno, dichos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Al usar un enlazador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se ven obligados a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, los documentos EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson y otros, Nat. Med. 9:129-134 (2003); y Hollinger y otros, PNAS USA 90: 6444-6448 (1993). Los triacuerpos y tetracuerpos también se describen en Hudson y otros, Nat. Med. 9: 129-134 (2003).

"Anticuerpo de dominio único" o "sdAb" o "nanocuerpo" se refiere a un fragmento de anticuerpo que consiste en la región variable de una cadena pesada de anticuerpo (dominio VH) o la región variable de una cadena ligera de anticuerpo (dominio VL) (Holt, L., y otros, Trends in Biotechnology, 21 (11): 484-490).

Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena sencilla" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una cadena polipeptídica única y en cualquier orientación (por ejemplo, VL-VH o VH-VL). Generalmente, el polipéptido scFv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de scFv, véase, por ejemplo, Pluckthün, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, eds. Rosenberg y Moore, (Springer-Verlag, Nueva York, 1994), págs. 269-315.

En una determinada modalidad, el scFv se une a un receptor alfa de folato, 5T4, integrina  $\alpha_v\beta_6$ , BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, familia de EGFR que incluye ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM,

FAP, AchR fetal, FR $\alpha$ , GD2, GD3, 'Glypican-3 (GPC3), HLA-A1 + MAGE1, HLA-A2 + MAGE1, HLA-A3 + MAGE1, HLA-A1 + NY-ESO-1, HLA-A2 + NY-ESO-1, HLA-A3 + NY-ESO-1, IL-11R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$ 2, Lambda, Lewis-Y, Kappa, Mesotelina, Mucl, Muc16, NCAM, Ligandos de NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSSX, Survivina, TAG72, TEM o polipéptido de VEGFR2.

5

#### b. Enlazadores

En ciertas modalidades, los CAR contemplados en el presente documento pueden comprender residuos del enlazador entre los diversos dominios, por ejemplo, entre los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>, añadidos para el espaciado y la conformación apropiados de la molécula. Los CAR contemplados en el presente documento pueden comprender uno, dos, tres, cuatro o cinco o más enlazadores. En modalidades particulares, la longitud de un enlazador es de aproximadamente 1 a aproximadamente 25 aminoácidos, de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 aminoácidos, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 aminoácidos, o cualquier longitud intermedia de aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador es de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más aminoácidos de longitud.

Los ejemplos ilustrativos de enlazadores incluyen polímeros de glicina (G)<sub>n</sub>; polímeros de glicina-serina (G<sub>1-5</sub>S<sub>1-5</sub>)<sub>n</sub>, donde n es un número entero de al menos uno, dos, tres, cuatro o cinco; polímeros de glicina-alanina; polímeros de alanina-serina; y otros enlazadores flexibles conocidos en la técnica. Los polímeros de glicina y glicina-serina están relativamente desestructurados y, por lo tanto, pueden servir como un enlace neutro entre dominios de proteínas de fusión tales como los CAR descritos en el presente documento. La glicina accede significativamente más espacio phi-psi que incluso la alanina, y es mucho menos restringida que los residuos con cadenas laterales más largas (ver Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992)). El experto en la técnica normalmente reconocerá que el diseño de un CAR en modalidades particulares puede incluir enlazadores que son total o parcialmente flexibles, de modo que el enlazador puede incluir un enlazador flexible, así como una o más porciones que confieren una estructura menos flexible para proporcionar una estructura deseada del CAR.

Otros enlazadores ilustrativos incluyen, sin limitación, las siguientes secuencias de aminoácidos: GGG; DGGGS (SEQ ID NO: 1); TGEKP (SEQ ID NO: 2) (véase, por ejemplo, Liu y otros, PNAS 5525-5530 (1997)); GGRR (SEQ ID NO: 3) (Pomerantz y otros, 1995, más arriba); (GGGS)<sub>n</sub> en donde n = 1, 2, 3, 4 o 5 (SEQ ID NO: 4) (Kim y otros, PNAS 93, 1156-1160 (1996.)); EGKSSGSGSESKVD (SEQ ID NO: 5) (Chaudhary y otros, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1066-1070); KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO: 6) (Bird y otros, 1988, Science 242: 423-426), GGRRGGGS (SEQ ID NO: 7); LRQRDGERP (SEQ ID NO: 8); LRQKDGGSERP (SEQ ID NO: 9); LRQKd(GGGS)<sub>2</sub> ERP (SEQ ID NO: 10). Alternativamente, los enlazadores flexibles pueden diseñarse racionalmente mediante el uso de un programa informático capaz de modelar tanto los sitios de unión al ADN como los péptidos mismos (Desjarlais y Berg, PNAS 90: 2256-2260 (1993), PNAS 91: 11099-11103 (1994) o métodos de presentación en fagos.

En modalidades particulares, un CAR comprende un scFV que comprende además una secuencia de unión de región variable. Una "secuencia de unión de región variable" es una secuencia de aminoácidos que conecta una región variable de la cadena pesada a una región variable de la cadena ligera y proporciona una función espaciadora compatible con la interacción de los dos subdominios de unión para que el polipéptido resultante conserve una afinidad de unión específica con la misma molécula objetivo que un anticuerpo que comprende las mismas regiones variables de cadena ligera y pesada. En una modalidad, la secuencia de unión de la región variable es de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más aminoácidos de longitud. En una modalidad particular, la secuencia de unión de la región variable comprende un polímero de glicina-serina (G<sub>1-5</sub>S<sub>1-5</sub>)<sub>n</sub>, donde n es un número entero de al menos 1, 2, 3, 4 o 5. En otra modalidad, la secuencia de unión de la región variable comprende un enlazador de aminoácidos (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>.

#### c. Dominio espaciador

En modalidades particulares, el dominio de unión del CAR está seguido por uno o más "dominios espaciadores", que se refiere a la región que aleja el dominio de unión al antígeno de la superficie de la célula efectora para permitir el contacto apropiado célula/célula, la unión al antígeno y la activación (Patel y otros, Gene Therapy, 1999; 6: 412-419). El dominio espaciador puede derivarse de una fuente natural, sintética, semisintética o recombinante. En ciertas modalidades, un dominio espaciador es una porción de una inmunoglobulina, que incluye, sin limitación, una o más regiones constantes de cadena pesada, por ejemplo, CH2 y CH3. El dominio espaciador puede incluir la secuencia de aminoácidos de una región bisagra de inmunoglobulina natural o una región bisagra de inmunoglobulina alterada.

En una modalidad, el dominio espaciador comprende el CH2 y CH3 de IgG1.

60

#### d. Dominio bisagra

El dominio de unión del CAR generalmente está seguido por uno o más "dominios bisagra", que desempeñan un papel en el posicionamiento del dominio de unión al antígeno lejos de la superficie de la célula efectora para permitir el contacto apropiado célula/célula, la unión al antígeno y la activación. Un CAR generalmente comprende uno o más dominios bisagra entre el dominio de unión y el dominio transmembrana (TM). El dominio bisagra puede derivarse de

65

una fuente natural, sintética, semisintética o recombinante. El dominio bisagra puede incluir la secuencia de aminoácidos de una región bisagra de inmunoglobulina natural o una región bisagra de inmunoglobulina alterada.

5 Los dominios bisagra ilustrativos adecuados para su uso en los CAR descritos en este documento incluyen la región bisagra derivada de las regiones extracelulares de proteínas de membrana de tipo 1 tales como CD8 $\alpha$ , CD4, CD28 y CD7, que pueden ser regiones bisagra de tipo silvestre de estas moléculas o pueden estar alteradas. En otra modalidad, el dominio bisagra comprende una región bisagra de CD8 $\alpha$ .

10 e. Dominio transmembrana (TM)

El "dominio transmembrana" es la porción del CAR que fusiona la porción de unión extracelular y el dominio de señalización intracelular y ancla el CAR a la membrana plasmática de la célula efectora inmunitaria. El dominio TM puede derivarse de una fuente natural, sintética, semisintética o recombinante.

15 Los dominios TM ilustrativos pueden derivarse (es decir, comprender al menos la(s) región(es) transmembrana) de la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD3 épsilon, CD3 zeta, CD4, CD5, CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137 y CD 154.

20 En una modalidad, los CAR contemplados en el presente documento comprenden un dominio TM derivado de CD8 $\alpha$ . En otra modalidad, un CAR contemplado en el presente documento comprende un dominio TM derivado de CD8 $\alpha$  y un enlazador oligo- o polipeptídico corto, preferentemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos de longitud que une el dominio TM y el dominio de señalización intracelular del CAR. Un enlazador de glicina-serina proporciona un enlazador particularmente adecuado.

25 f. Dominio de señalización intracelular

30 En modalidades particulares, los CAR contemplados en el presente documento comprenden un dominio de señalización intracelular. Un "dominio de señalización intracelular" se refiere a la parte de un CAR que participa en la transducción del mensaje de la unión eficaz del CAR a un antígeno objetivo en el interior de la célula efectora inmunitaria para provocar la función de la célula efectora, por ejemplo, activación, producción de citocinas, proliferación y actividad citotóxica, que incluye la liberación de factores citotóxicos contra la célula objetivo unida al CAR, u otras respuestas celulares provocadas con la unión del antígeno al dominio extracelular del CAR.

35 El término "función efectora" se refiere a una función especializada de la célula. La función efectora de la célula T, por ejemplo, puede ser una actividad citolítica o ayuda o actividad que incluye la secreción de una citocina. Por lo tanto, el término "dominio de señalización intracelular" se refiere a la porción de una proteína que transduce la señal de la función efectora y que dirige a la célula a realizar una función especializada. Aunque generalmente se puede emplear todo el dominio de señalización intracelular, en muchos casos no es necesario usar todo el dominio. En la medida en que se usa una porción truncada de un dominio de señalización intracelular, dicha porción truncada se puede usar en lugar del dominio completo siempre que transduzca la señal de la función efectora. El término dominio de señalización intracelular está destinado a incluir cualquier porción truncada del dominio de señalización intracelular suficiente para transducir la señal de la función efectora.

45 Se sabe que las señales generadas a través del TCR solo son insuficientes para la activación completa de la célula T y que también se requiere una señal secundaria o coestimuladora. Por lo tanto, se puede decir que la activación de las células T está mediada por dos clases distintas de dominios de señalización intracelular: dominios de señalización primaria que inician la activación primaria dependiente de antígeno a través del TCR (por ejemplo, un complejo TCR/CD3) y dominios de señalización coestimuladora que actúan en una manera independiente del antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora. En modalidades preferidas, un CAR contemplado en el presente documento comprende un dominio de señalización intracelular que comprende uno o más "dominios de señalización coestimuladora" y un "dominio de señalización primaria".

50 Los dominios de señalización primaria regulan la activación primaria del complejo TCR, ya sea de forma estimuladora o inhibitoria. Los dominios de señalización primaria que actúan de manera estimuladora pueden contener motivos de señalización que se conocen como motivos de activación basados en tirosina del inmunorreceptor o ITAM.

55 Los ejemplos ilustrativos de ITAM que contienen dominios de señalización primaria que son de uso particular en la invención incluyen los derivados de TCR $\zeta$ , FcR $\gamma$ , FcR $\beta$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ , CD3 $\zeta$ , CD22, CD79a, CD79b y CD66d. En modalidades preferidas particulares, un CAR comprende un dominio de señalización primaria de CD3 $\zeta$  y uno o más dominios de señalización coestimuladora. Los dominios de señalización primaria intracelular y de señalización coestimuladora pueden estar unidos en cualquier orden en tándem al terminal carboxilo del dominio transmembrana.

60 Los CAR contemplados en el presente documento comprenden uno o más dominios de señalización coestimuladora para mejorar la eficacia y la expansión de las células T que expresan los receptores CAR. Como se usa en el presente documento, el término "dominio de señalización coestimuladora" o "dominio de coestimulación" se refiere a un dominio de señalización intracelular de una molécula coestimuladora.

Ejemplos ilustrativos de tales moléculas coestimuladoras incluyen CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), CD30, CD40, PD-1, ICOS (CD278), CTLA4, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, TRIM, LCK3, SLAM, DAP10, LAG3, HVEM y NKD2C, y CD83. En una modalidad, un CAR comprende uno o más dominios de señalización coestimuladora seleccionados del grupo que consiste en CD28, CD137 y CD134, y un dominio de señalización primaria de CD3ζ.

En una modalidad, un CAR comprende un scFv que se une a un receptor alfa de folato, 5T4, integrina  $\alpha\beta_6$ , BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, familia de EGFR que incluye ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetal, FR $\alpha$ , GD2, GD3, 'Glypican-3 (GPC3), HLA-A1 + MAGE1, HLA-A2 + MAGE1, HLA-A3 + MAGE1, HLA-A1 + NY-ESO-1, HLA-A2 + NY-ESO-1, HLA-A3 + NY-ESO-1, IL-11R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$  2, Lambda, Lewis-Y, Kappa, Mesotelina, Mucl, Muc16, NCAM, Ligandos de NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, Survivina, TAG72, TEM o polipéptido de VEGFR2; un dominio transmembrana derivado de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: CD8 $\alpha$ ; CD4, CD45, PD1 y CD152; y uno o más dominios de señalización coestimuladora intracelular seleccionados del grupo que consiste en: CD28, CD54, CD134, CD137, CD152, CD273, CD274 y CD278; y un dominio de señalización primaria de CD3ζ.

En otra modalidad, un CAR comprende un scFv que se une a un receptor alfa de folato, 5T4, integrina  $\alpha\beta_6$ , BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, familia de EGFR que incluye ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetal, FR $\alpha$ , GD2, GD3, 'Glypican-3 (GPC3), HLA-A1 + MAGE1, HLA-A2 + MAGE1, HLA-A3 + MAGE1, HLA-A1 + NY-ESO-1, HLA-A2 + NY-ESO-1, HLA-A3 + NY-ESO-1, IL-11R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$  2, Lambda, Lewis-Y, Kappa, Mesotelina, Mucl, Muc16, NCAM, Ligandos de NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, Survivina, TAG72, TEM o polipéptido de VEGFR2; un dominio bisagra seleccionado del grupo que consiste en: bisagra de IgG1/CH2/CH3 y CD8 $\alpha$ , y CD8 $\alpha$ ; un dominio transmembrana derivado de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: CD8 $\alpha$ ; CD4, CD45, PD1 y CD152; y uno o más dominios de señalización coestimuladora intracelular seleccionados del grupo que consiste en: CD28, CD134 y CD137; y un dominio de señalización primaria de CD3ζ.

En otra modalidad más, un CAR comprende un scFv, que comprende además un enlazador, que se une a un receptor de folato alfa, 5T4, integrina  $\alpha\beta_6$ , BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, familia de EGFR que incluye ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetal, FR $\alpha$ , GD2, GD3, 'Glypican-3 (GPC3), HLA-A1 + MAGE1, HLA-A2 + MAGE1, HLA-A3 + MAGE1, HLA-A1 + NY-ESO-1, HLA-A2 + NY-ESO-1, HLA-A3 + NY-ESO-1, IL-11 R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$  2, Lambda, Lewis-Y, Kappa, Mesotelina, Mucl, Ligandos Muc16, NCAM, NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, Survivina, TAG72, TEM o polipéptido de VEGFR2; un dominio bisagra seleccionado del grupo que consiste en: bisagra de IgG1/CH2/CH3 y CD8 $\alpha$ , y CD8 $\alpha$ ; un dominio transmembrana que comprende un dominio TM derivado de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: CD8 $\alpha$ ; CD4, CD45, PD1 y CD152, y un enlazador oligo- o polipeptídico corto, preferentemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos de longitud que une el dominio TM al dominio de señalización intracelular del CAR; y uno o más dominios de señalización coestimuladora intracelular seleccionados del grupo que consiste en: CD28, CD134 y CD137; y un dominio de señalización primaria de CD3ζ.

En una modalidad particular, un CAR comprende un scFv que se une a un receptor alfa de folato, 5T4, integrina  $\alpha\beta_6$ , BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, familia de EGFR que incluye ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetal, FR $\alpha$ , GD2, GD3, 'Glypican-3 (GPC3), HLA-A1 + MAGE1, HLA-A2 + MAGE1, HLA-A3 + MAGE1, HLA-A1 + NY-ESO-1, HLA-A2 + NY-ESO-1, HLA-A3 + NY-ESO-1, IL-11R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$  2, Lambda, Lewis-Y, Kappa, Mesotelina, Mucl, Muc16, NCAM, Ligandos de NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, Survivina, TAG72, TEM o polipéptido de VEGFR2; un dominio bisagra que comprende un polipéptido de CD8 $\alpha$ ; un dominio transmembrana de CD8 $\alpha$  que comprende un enlazador polipeptídico de aproximadamente 3 aminoácidos; uno o más dominios de señalización coestimuladora intracelular seleccionados del grupo que consiste en: CD28, CD134 y CD137; y un dominio de señalización primaria de CD3ζ.

#### E. Polipéptidos

La presente descripción contempla, en parte, los polipéptidos de CAR y TCR modificados y sus fragmentos, las células y las composiciones que los comprenden, y los vectores que expresan los polipéptidos. "Polipéptido", "fragmento de polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente y se refieren a un polímero de aminoácidos recombinante, sintético o no natural. Los polipéptidos no están limitados a una longitud específica, por ejemplo, pueden comprender una secuencia de proteína de longitud completa o un fragmento de una proteína de longitud completa, y pueden incluir modificaciones postraduccionales del polipéptido, por ejemplo, glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y similares, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto de origen natural como de origen no natural. En diversas modalidades, los polipéptidos contemplados en el presente documento comprenden una secuencia señal (o líder) en el extremo N-terminal de la proteína, que dirige la transferencia de la proteína de manera cotraduccional o postraduccional. Los ejemplos ilustrativos de secuencias señal adecuadas útiles en el presente documento incluyen, sin limitación, el polipéptido señal de cadena pesada de IgG1, un polipéptido señal de CD8 $\alpha$  o un polipéptido señal

del receptor alfa de GM-CSF humano. Los polipéptidos pueden prepararse mediante el uso de cualquiera de una variedad de técnicas recombinantes y/o sintéticas bien conocidas. Los polipéptidos contemplados en el presente documento abarcan específicamente los CAR de la presente descripción, o secuencias que tienen deleciones, adiciones y/o sustituciones de uno o más aminoácidos de un polipéptido como se contempla en el presente documento.

5 Los polipéptidos incluyen "variantes de polipéptidos". Las variantes de polipéptidos pueden diferir de un polipéptido natural en una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones. Dichas variantes pueden ser de origen natural o pueden generarse sintéticamente, por ejemplo, mediante la modificación de una o más de las secuencias de polipéptidos anteriores. Por ejemplo, en ejemplos particulares, puede ser conveniente mejorar la afinidad de unión y/u  
10 otras propiedades biológicas de los CAR o TCR modificados mediante la introducción de una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones. Preferentemente, los polipéptidos de la invención incluyen polipéptidos que tienen al menos aproximadamente 65 %, 70 %, 75 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de identidad de aminoácidos con estos.

15 Los polipéptidos incluyen "fragmentos de polipéptidos". Los fragmentos de polipéptidos se refieren a un polipéptido, que puede ser monomérico o multimérico, que tiene una deleción amino terminal, una deleción carboxilo terminal y/o una deleción o sustitución interna de un polipéptido producido de forma natural o recombinante. En ciertos ejemplos, un fragmento de polipéptido puede comprender una cadena de aminoácidos de al menos 5 a aproximadamente 500 aminoácidos de longitud. Se apreciará que en ciertos ejemplos, los fragmentos son de al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11,  
20 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 o 450 aminoácidos de longitud.

25 El polipéptido también puede fusionarse en marco o conjugarse con un enlazador u otra secuencia para facilitar la síntesis, purificación o identificación del polipéptido (por ejemplo, poli-His), o para mejorar la unión del polipéptido a un soporte sólido.

30 Como se señaló anteriormente, los polipéptidos contemplados en el presente documento pueden alterarse de diversas maneras, que incluyen sustituciones, deleciones, truncamientos e inserciones de aminoácidos. Los métodos para tales manipulaciones son generalmente conocidos en la técnica. Por ejemplo, las variantes de secuencia de aminoácidos de un polipéptido de referencia se pueden preparar mediante mutaciones en el ADN. Los métodos para mutagénesis y alteraciones de la secuencia de nucleótidos son bien conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Kunkel (1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 488-492), Kunkel y otros, (1987, Methods in Enzymol, 154: 367-382), la patente de EE.UU. núm. 4,873,192, Watson, J.D. y otros, (Molecular Biology of the Gene, cuarta edición, Benjamin/Cummings, Menlo  
35 Park, California, 1987) y las referencias citadas allí. Se puede encontrar orientación sobre las sustituciones de aminoácidos apropiadas que no afectan la actividad biológica de la proteína de interés en el modelo de Dayhoff y otros, (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.).

40 En ciertas modalidades, una variante contendrá sustituciones conservadoras. Una "sustitución conservadora" es aquella en la que un aminoácido se sustituye por otro aminoácido que tiene propiedades similares, de manera que un experto en la técnica de la química de péptidos esperaría que la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido no cambien sustancialmente. Se pueden realizar modificaciones en la estructura de los polinucleótidos y polipéptidos de la presente invención y todavía obtener una molécula funcional que codifique un polipéptido variante o derivado con características convenientes.

45 Las variantes de polipéptidos incluyen además formas glucosiladas, conjugados agregativos con otras moléculas y conjugados covalentes con restos químicos no relacionados (por ejemplo, moléculas pegiladas). Las variantes covalentes se pueden preparar mediante la unión de grupos funcionales a grupos que se encuentran en la cadena de aminoácidos o en el residuo N o C-terminal, como se conoce en la técnica. Las variantes incluyen además variantes alélicas, variantes de especies y muteínas. Los truncamientos o deleciones de regiones que no afectan la actividad funcional de las proteínas también son variantes.

50 En una modalidad, donde se desea la expresión de dos o más polipéptidos, las secuencias de polinucleótidos que los codifican pueden separarse mediante una secuencia IRES como se analiza en otra parte del presente documento. En otra modalidad, dos o más polipéptidos pueden expresarse como una proteína de fusión que comprende una o más secuencias de polipéptidos autoescindibles.

55 Los polipéptidos de la presente invención incluyen polipéptidos de fusión. En modalidades preferidas, se proporcionan polipéptidos de fusión y polinucleótidos que codifican polipéptidos de fusión. Los polipéptidos de fusión y las proteínas de fusión se refieren a un polipéptido que tiene al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez o más segmentos de polipéptidos. Los polipéptidos de fusión están típicamente unidos del C-terminal al N-terminal, aunque también pueden estar unidos del C-terminal al C-terminal, del N-terminal al N-terminal o del N-terminal al C-terminal. Los polipéptidos de la proteína de fusión pueden estar en cualquier orden o en un orden específico. Los polipéptidos de fusión o las proteínas de fusión también pueden incluir variantes modificadas de forma conservadora, variantes polimórficas, alelos, mutantes, subsecuencias y homólogos entre especies, siempre que se mantenga la actividad transcripcional deseada del polipéptido de fusión. Los polipéptidos de fusión pueden producirse por métodos químicos

5 sintéticos o por enlace químico entre los dos restos o generalmente pueden prepararse mediante el uso de otras técnicas estándar. Las secuencias de ADN ligadas que comprenden el polipéptido de fusión están operativamente unidas a elementos de control transcripcionales o traduccionales adecuados como se analiza en otra parte del presente documento.

10 En una modalidad, una pareja de fusión comprende una secuencia que ayuda a expresar la proteína (un potenciador de la expresión) con rendimientos más altos que la proteína recombinante nativa. Se pueden seleccionar otras parejas de fusión para aumentar la solubilidad de la proteína o para permitir que la proteína se dirija a los compartimentos intracelulares deseados o para facilitar el transporte de la proteína de fusión a través de la membrana celular.

15 Los polipéptidos de fusión pueden comprender además una señal de escisión de polipéptidos entre cada uno de los dominios de polipéptidos descritos en este documento. Además, el sitio del polipéptido se puede poner en cualquier secuencia peptídica enlazadora. Ejemplos de señales de escisión de polipéptidos incluyen sitios de reconocimiento de escisión de polipéptidos tales como sitios de escisión de proteasas, sitios de escisión de nucleasas (por ejemplo, sitios de reconocimiento de enzimas de restricción raras, sitios de reconocimiento de ribozimas de autoescisión) y oligopéptidos virales de autoescisión (ver deFelipe y Ryan, 2004. Traffic, 5 (8); 616-26).

20 Los sitios de escisión de proteasas adecuados y los péptidos de autoescisión son conocidos por el experto (véase, por ejemplo, en Ryan y otros, 1997. J. Gener. Virol 78, 699-722; Scymczak y otros (2004) Nature Biotech. 5, 589-594). Los sitios de escisión de proteasa ilustrativos incluyen, sin limitación, los sitios de escisión de proteasas NIa de potyvirus (por ejemplo, proteasa del virus del grabado del tabaco), proteasas HC de potyvirus, proteasas PI de potyvirus (P35), proteasas NIa de byovirus, proteasas codificadas por ARN-2 de byovirus, proteasas L de aftovirus, proteasas 2A de enterovirus, proteasas 2A de rinovirus, proteasas 3C de picornavirus, proteasas 24K de comovirus, proteasas 24K de nepovirus, proteasa similar a 3C del RTSV (virus esférico del tungro del arroz), proteasa similar a 3C del PYVF (virus de la mancha amarilla de la chirivía), heparina, trombina, factor Xa y enteroquinasa. Debido a su alta rigurosidad de escisión, se prefieren los sitios de escisión de proteasas de TEV (virus del grabado del tabaco) en una modalidad, por ejemplo, EXXYXQ (G/S) (SEQ ID NO: 11), por ejemplo, ENLYFQG (SEQ ID NO: 12) y ENLYFQS (SEQ ID NO: 13), en donde X representa cualquier aminoácido (la escisión por TEV ocurre entre Q y G o Q y S).

30 En una modalidad particular, los péptidos autoescindibles incluyen aquellas secuencias de polipéptidos obtenidas a partir de péptidos 2A de potyvirus y cardiovirus, FMDV (virus de la fiebre aftosa), virus de la rinitis equina A, virus de Thoesa asigna y teschovirus porcino.

35 En ciertas modalidades, el sitio de autoescisión del polipéptido comprende un sitio, secuencia o dominio 2A o de tipo 2A (Donnelly y otros, 2001. J. Gen. Virol. 82: 1027-1041).

#### F. Polinucleótidos

40 En ejemplos particulares, se proporcionan polinucleótidos que codifican uno o más polipéptidos de CAR o TCR modificados contemplados en el presente documento. Como se usa en este documento, los términos "polinucleótido" o "ácido nucleico" se refieren a ARN mensajero (ARNm), ARN, ARN genómico (ARNg), ARN de cadena positiva (ARN(+)), ARN de cadena negativa (ARN (-)), ADN genómico (ADNg), ADN complementario (ADNc), ADN recombinante, ADN sintético o ADN no natural. Los polinucleótidos incluyen polinucleótidos monocatenarios y bicatenarios. Preferentemente, los polinucleótidos de la invención incluyen polinucleótidos o variantes que tienen al menos aproximadamente 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de referencia descritas en este documento (véase, por ejemplo, el Listado de secuencias), típicamente donde la variante mantiene al menos una actividad biológica de la secuencia de referencia. En varios ejemplos ilustrativos, la presente descripción contempla, en parte, polinucleótidos que comprenden vectores de expresión, vectores virales y plásmidos de transferencia, y composiciones, y células que los comprenden.

50 En ejemplos particulares, esta descripción proporciona polinucleótidos que codifican al menos aproximadamente 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 1000, 1250, 1500, 1750 o 2000 o más residuos de aminoácidos contiguos de un polipéptido de la descripción, así como todas las longitudes intermedias. Se entenderá fácilmente que "longitudes intermedias", en este contexto, significa cualquier longitud entre los valores citados, como 6, 7, 8, 9, etc., 101, 102, 103, etc.; 151, 152, 153, etc.; 201, 202, 203, etc.

60 Como se usa en el presente documento, los términos "variante polinucleotídica" y "variante" y similares se refieren a polinucleótidos que muestran una identidad de secuencia sustancial con una secuencia polinucleotídica de referencia o polinucleótidos que hibridan con una secuencia de referencia en condiciones rigurosas que se definen a continuación. Estos términos incluyen polinucleótidos en los que se han agregado o eliminado uno o más nucleótidos, o se han reemplazado con diferentes nucleótidos en comparación con un polinucleótido de referencia. A este respecto, se entiende bien en la técnica que pueden realizarse ciertas alteraciones que incluyen mutaciones, adiciones, deleciones y sustituciones a un polinucleótido de referencia mediante lo cual el polinucleótido alterado retiene la función o actividad biológica del polinucleótido de referencia.

- Las frases "identidad de secuencia" o, por ejemplo, que comprende una "secuencia 50 % idéntica a", como se usa en el presente documento, se refieren al grado en que las secuencias son idénticas sobre la base de cada nucleótido o aminoácido a lo largo de una ventana de comparación. Por lo tanto, se puede calcular un "porcentaje de identidad de secuencia" comparando dos secuencias alineadas óptimamente en la ventana de comparación, al determinar el número de posiciones en las que la base de ácido nucleico idéntica (por ejemplo, A, T, C, G, I) o el residuo de aminoácido idéntico (por ejemplo, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys y Met) ocurre en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, dividir el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicar el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. Se incluyen nucleótidos y polipéptidos que tienen al menos aproximadamente 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de referencia descritas en el presente documento, típicamente donde la variante de polipéptido mantiene al menos una actividad biológica del polipéptido de referencia.
- Los términos utilizados para describir las relaciones de secuencia entre dos o más polinucleótidos o polipéptidos incluyen "secuencia de referencia", "ventana de comparación", "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia" e "identidad sustancial". Una "secuencia de referencia" tiene una longitud de al menos 12 pero con frecuencia de 15 a 18 y, a menudo, de al menos 25 unidades monoméricas, incluidos nucleótidos y residuos de aminoácidos. Debido a que dos polinucleótidos pueden comprender cada uno (1) una secuencia (es decir, solo una porción de la secuencia completa de polinucleótidos) que es similar entre los dos polinucleótidos, y (2) una secuencia que es divergente entre los dos polinucleótidos, las comparaciones de secuencias entre dos (o más) polinucleótidos se realizan típicamente mediante la comparación de las secuencias de los dos polinucleótidos en una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación" se refiere a un segmento conceptual de al menos 6 posiciones contiguas, generalmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 100, más generalmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150 en el que se compara una secuencia con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después que las dos secuencias están alineadas de manera óptima. La ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) de aproximadamente el 20 % o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. La alineación óptima de las secuencias para alinear una ventana de comparación puede llevarse a cabo mediante implementaciones computarizadas de algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, EE. UU.) o por inspección y la mejor alineación (es decir, que da como resultado el mayor porcentaje de homología en la ventana de comparación) es generada por cualquiera de los diversos métodos seleccionados. También se puede hacer referencia a la familia de programas BLAST como se describe por ejemplo por Altschul y otros, 1997, Nucl. Acids Res. 25: 3389. Se puede encontrar un estudio detallado del análisis de secuencia en la Unidad 19.3 de Ausubel y otros, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Capítulo 15.
- Los polinucleótidos de la presente invención, independientemente de la longitud de la secuencia codificante en sí misma, pueden combinarse con otras secuencias de ADN, tales como promotores y/o potenciadores, regiones no traducidas (UTR), secuencias de Kozak, señales de poliadenilación, sitios de enzimas de restricción adicionales, múltiples sitios de clonación, sitios internos de entrada al ribosoma (IRES), sitios de reconocimiento de recombinasas (por ejemplo, sitios LoxP, FRT y Att), codones de terminación, señales de terminación transcripcional y polinucleótidos que codifican polipéptidos autoescindibles, etiquetas de epítopos, como se describe en otra parte del presente documento o como se conoce en la técnica, de modo que su longitud total puede variar considerablemente. Por lo tanto, se contempla que se pueda emplear un fragmento de polinucleótido de casi cualquier longitud, de manera que la longitud total preferentemente está limitada por la facilidad de preparación y uso en el protocolo previsto de ADN recombinante.
- Los polinucleótidos pueden prepararse, manipularse y/o expresarse mediante el uso de cualquiera de una variedad de técnicas bien establecidas conocidas y disponibles en la técnica. Para expresar un polipéptido deseado, una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido se puede insertar en el vector apropiado. Ejemplos de vectores son plásmidos, secuencias de replicación autónoma y elementos transponibles. Los vectores ilustrativos adicionales incluyen, sin limitación, plásmidos, fagémidos, cósmidos, cromosomas artificiales como el cromosoma artificial de levadura (YAC), el cromosoma artificial bacteriano (BAC) o el cromosoma artificial derivado de P1 (PAC), bacteriófagos como el fago lambda o el fago M13 y virus animales. Los ejemplos de categorías de virus animales útiles como vectores incluyen, sin limitación, retrovirus (incluidos los lentivirus), adenovirus, virus adenoasociados, herpesvirus (por ejemplo, virus del herpes simple), poxvirus, baculovirus, papilomavirus y papovavirus (por ejemplo, SV40). Ejemplos de vectores de expresión son los vectores pCIneo (Promega) para la expresión en células de mamíferos; pLenti4/V5-DEST™, pLenti6/V5-DEST™ y pLenti6.2/V5-GW/lacZ (Invitrogen) para la transferencia y expresión génica mediada por lentivirus en células de mamíferos. En modalidades particulares, las secuencias codificantes de las proteínas quiméricas descritas en el presente documento pueden ligarse en dichos vectores de expresión para la expresión de la proteína quimérica en células de mamífero.
- Los "elementos de control" o "secuencias reguladoras" presentes en un vector de expresión son aquellas regiones no traducidas del vector: origen de replicación, casetes de selección, promotores, potenciadores, señales de iniciación

de traducción (secuencia de Shine Dalgarno o secuencia de Kozak) intrones, una secuencia de poliadenilación, regiones no traducidas en 5' y 3', que interactúan con las proteínas celulares del huésped para llevar a cabo la transcripción y la traducción. Dichos elementos pueden variar en su resistencia y especificidad. Según el sistema de vectores y del huésped utilizado, se puede usar cualquier número de elementos de transcripción y traducción adecuados, incluidos promotores ubicuos y promotores inducibles.

En un ejemplo particular, un vector para usar en la práctica de la materia descrita en el presente documento que incluye, sin limitación, vectores de expresión y vectores virales, incluirá secuencias de control exógenas, endógenas o heterólogas tales como promotores y/o potenciadores. Una secuencia de control "endógena" es aquella que está naturalmente ligada a un gen dado en el genoma. Una secuencia de control "exógena" es aquella que se coloca en yuxtaposición a un gen mediante manipulación genética (es decir, técnicas de biología molecular) de modo que la transcripción de ese gen es dirigida por el potenciador/promotor vinculado. Una secuencia de control "heteróloga" es una secuencia exógena que es de una especie diferente a la célula que está siendo manipulada genéticamente.

El término "promotor", como se usa en el presente documento, se refiere a un sitio de reconocimiento de un polinucleótido (ADN o ARN) al que se une una ARN polimerasa. Una ARN polimerasa inicia y transcribe polinucleótidos operativamente unidos al promotor. En modalidades particulares, los promotores operativos en células de mamífero comprenden una región rica en AT ubicada aproximadamente de 25 a 30 bases hacia el extremo corriente arriba del sitio donde se inicia la transcripción y/u otra secuencia encontrada 70 a 80 bases hacia el extremo corriente arriba del inicio de la transcripción, una región CNCAAT donde N puede ser cualquier nucleótido.

El término "potenciador" se refiere a un segmento de ADN que contiene secuencias capaces de proporcionar una transcripción mejorada y en algunos casos puede funcionar independientemente de su orientación con respecto a otra secuencia de control. Un potenciador puede funcionar de forma cooperativa o aditiva con promotores y/u otros elementos potenciadores. El término "promotor/potenciador" se refiere a un segmento de ADN que contiene secuencias que pueden proporcionar funciones tanto de promotor como de potenciador.

El término "operativamente unido" se refiere a una yuxtaposición en donde los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera prevista. En una modalidad, el término se refiere a una unión funcional entre una secuencia de control de la expresión del ácido nucleico (tal como un promotor y/o potenciador) y una segunda secuencia de polinucleótido, por ejemplo, un polinucleótido de interés, en donde la secuencia de control de la expresión dirige la transcripción del ácido nucleico correspondiente a la segunda secuencia.

Como se usa en el presente documento, el término "secuencia de control de expresión constitutiva" se refiere a un promotor, potenciador o promotor/potenciador que permite continuamente la transcripción de una secuencia unida operativamente. Una secuencia de control de expresión constitutiva puede ser un promotor, potenciador o promotor/potenciador "ubicuos" que permite la expresión en una amplia variedad de tipos de células y tejidos o un promotor, potenciador o promotor/potenciador "específico de célula", "específico de un tipo de célula", "específico de un linaje celular" o "específico de tejido" que permite la expresión en una variedad restringida de tipos de células y tejidos, respectivamente.

Las secuencias de control de expresión ubicuas ilustrativas adecuadas para su uso en modalidades particulares de la invención incluyen, sin limitación, un promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV), uno de virus de simio 40 (SV40) (por ejemplo, temprano o tardío), un promotor LTR del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV), un LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV), un promotor (de timidina quinasa) del virus del herpes simple (HSV), promotores H5, P7.5 y P11 del virus vaccinia, un promotor del factor de alargamiento 1-alfa (EF1a), respuesta de crecimiento temprano 1 (EGR1), ferritina H (FerH), ferritina L (FerL), gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), factor de iniciación de la traducción eucariota 4A1 (EIF4A1), proteína 5 de choque térmico de 70 kDa (HSPA5), proteína beta de choque térmico de 90 kDa, miembro 1 (HSP90B1), proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70),  $\beta$ -kinesina ( $\beta$ -KIN), el locus ROSA 26 humano (Irions y otros, Nature Biotechnology 25, 1477 - 1482 (2007)), un promotor de Ubiquitina C (UBC), un promotor de fosfoglicerato quinasa-1 (PGK), un potenciador de citomegalovirus/promotor de  $\beta$ -actina de pollo (CAG), un promotor de  $\beta$ -actina y un potenciador del virus del sarcoma mieloproliferativo, región de control negativo eliminada, promotor sustituido con sitio de unión a cebador de dl587rev (MND) (Challita y otros, J Virol. 69(2):748-55 (1995)).

En un ejemplo particular, puede ser conveniente expresar un polinucleótido que comprenda un CAR o TCR modificado a partir de un promotor que proporcione una expresión estable y a largo plazo en las células T y en niveles suficientes para redirigir las células T a las células que expresan el antígeno objetivo. En una modalidad preferida, el promotor es un promotor de EF1 $\alpha$  o un promotor de MND.

Como se usa en el presente documento, "expresión condicional" puede referirse a cualquier tipo de expresión condicional que incluye, sin limitación, expresión inducible; expresión reprimible; expresión en células o tejidos que tienen un estado fisiológico, biológico o patológico particulares, etc. Esta definición no pretende excluir la expresión específica de tejido o del tipo de célula. Ciertas modalidades de la invención proporcionan la expresión condicional de un polinucleótido de interés, por ejemplo, la expresión se controla al someter a una célula, tejido, organismo, etc., a

un tratamiento o condición que hace que el polinucleótido se exprese o que provoque un aumento o disminución en la expresión del polinucleótido codificado por el polinucleótido de interés.

Los ejemplos ilustrativos de promotores/sistemas inducibles incluyen, sin limitación, promotores inducibles con esteroides tales como promotores para genes que codifican receptores de glucocorticoides o estrógenos (inducibles por tratamiento con la hormona correspondiente), promotor de metalotionina (inducible por tratamiento con varios metales pesados), promotor de MX-1 (inducible por interferón), el sistema regulable de mifepristona "GeneSwitch" (Sirin y otros, 2003, Gene, 323: 67), el interruptor génico inducible por cumato (documento WO 2002/088346), sistemas reguladores dependientes de tetraciclina, etc.

La expresión condicional también se puede lograr mediante el uso de una recombinasa de ADN específica de un sitio. De acuerdo con ciertas modalidades de la invención, el vector comprende al menos un (típicamente dos) sitio(s) para la recombinación mediada por una recombinasa específica del sitio. Como se usa en el presente documento, los términos "recombinasa" o "recombinasa específica de un sitio" incluyen proteínas, enzimas, cofactores o proteínas asociadas de escisión o integradoras que están involucradas en reacciones de recombinación que implican uno o más sitios de recombinación (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, siete, diez, doce, quince, veinte, treinta, cincuenta, etc.), que pueden ser proteínas de tipo silvestre (véase Landy, Current Opinion in Biotechnology 3: 699-707 (1993)), o mutantes, derivados (por ejemplo, proteínas de fusión que contienen las secuencias de proteínas de recombinación o fragmentos de estas), fragmentos y variantes de estos. Los ejemplos ilustrativos de recombinasas adecuadas para su uso en modalidades particulares de la presente invención incluyen, sin limitación: Cre, Int, IHF, Xis, Flp, Fis, Hin, Gin, ΦC31, Cin, Tn3 resolvasa, TndX, XerC, XerD, TnpX, Hjc, Gin, SpCCE1, y ParA.

#### G. Vectores virales

En ejemplos particulares, la población de células que comprende células T, por ejemplo, PBMC, o una población purificada de células T se transduce con un vector retroviral, por ejemplo, un vector lentiviral, que codifica un CAR o TCR modificado como se contempla en este documento. Las células T transducidas provocan una respuesta de células T estable, a largo plazo y persistente.

Como se usa en el presente documento, el término "retrovirus" se refiere a un virus de ARN que transcribe inversamente su ARN genómico en una copia lineal de ADN de doble cadena y posteriormente integra covalentemente su ADN genómico en un genoma del huésped. Los retrovirus ilustrativos adecuados para su uso en ejemplos particulares incluyen, sin limitación: virus de la leucemia murina de Moloney (M-MuLV), virus del sarcoma murino de Moloney (MoMSV), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus de tumor mamario murino (MuMTV), virus de la leucemia del mono gibón (GaLV), virus de la leucemia felina (FLV), spumavirus, virus de la leucemia murina de Friend, virus de células madre murinas (MSCV) y virus del sarcoma de Rous (RSV) y lentivirus.

Como se usa en el presente documento, el término "lentivirus" se refiere a un grupo (o género) de retrovirus complejos. Los lentivirus ilustrativos incluyen, sin limitación: VIH (virus de inmunodeficiencia humana; que incluye VIH tipo 1 y VIH tipo 2); virus visna-maedi (VMV); virus de la artritis-encefalitis caprina (CAEV); virus de la anemia infecciosa equina (EIAV); virus de inmunodeficiencia felina (FIV); virus de inmunodeficiencia bovina (BIV); y virus de inmunodeficiencia en simios (SIV). En una modalidad, se prefieren cadenas principales de vectores basados en VIH (es decir, elementos de secuencia del VIH que actúan en cis).

El término "vector" se usa en el presente documento para referirse a una molécula de ácido nucleico que puede transferir o transportar otra molécula de ácido nucleico. El ácido nucleico transferido está generalmente unido a, por ejemplo, insertado en, la molécula del vector de ácido nucleico. Un vector puede incluir secuencias que dirigen la replicación autónoma en una célula, o puede incluir secuencias suficientes para permitir la integración en el ADN de la célula huésped. Los vectores útiles incluyen, por ejemplo, plásmidos (por ejemplo, plásmidos de ADN o plásmidos de ARN), transposones, cósmidos, cromosomas artificiales bacterianos y vectores virales. Los vectores virales útiles incluyen, por ejemplo, retrovirus y lentivirus defectuosos en la replicación.

Como será evidente para un experto en la técnica, el término "vector viral" se usa ampliamente para referirse a una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un plásmido de transferencia) que incluye elementos de ácido nucleico derivados de virus que típicamente facilitan la transferencia de la molécula de ácido nucleico o integración en el genoma de una célula o en una partícula viral que media la transferencia de ácido nucleico. Las partículas virales típicamente incluirán varios componentes virales y, a veces, también componentes de la célula huésped además del (de los) ácido(s) nucleico(s).

El término vector viral puede referirse a un virus o partícula viral que puede transferir un ácido nucleico a una célula o al propio ácido nucleico transferido. Los vectores virales y los plásmidos de transferencia contienen elementos genéticos estructurales y/o funcionales que se derivan principalmente de un virus. El término "vector retroviral" se refiere a un vector viral o plásmido que contiene elementos genéticos estructurales y funcionales, o porciones de estos, que se derivan principalmente de un retrovirus. El término "vector lentiviral" se refiere a un vector viral o plásmido que contiene elementos genéticos estructurales y funcionales, o porciones de estos, que incluyen LTR que se derivan principalmente de un lentivirus. El término "vector híbrido" se refiere a un vector, LTR u otro ácido nucleico que contiene

tanto secuencias retrovirales, por ejemplo, lentivirales, como secuencias virales no lentivirales. En un ejemplo, un vector híbrido se refiere a un vector o plásmido de transferencia que comprende secuencias retrovirales, por ejemplo, lentivirales, para la transcripción inversa, replicación, integración y/o empaquetamiento.

5 En modalidades particulares, los términos "vector lentiviral", "vector de expresión lentiviral" pueden usarse para referirse a plásmidos de transferencia lentivirales y/o partículas lentivirales infecciosas. Cuando se hace referencia en este documento a elementos tales como sitios de clonación, promotores, elementos reguladores, ácidos nucleicos heterólogos, etc., se debe entender que las secuencias de estos elementos están presentes en forma de ARN en las partículas lentivirales de la invención y están presentes en forma de ADN en los plásmidos de ADN de la descripción.

10 En cada extremo del provirus hay estructuras llamadas "repeticiones terminales largas" o "LTR". El término "repetición terminal larga (LTR)" se refiere a dominios de pares de bases ubicados en los extremos de los ADN retrovirales que, en su contexto de secuencia natural, son repeticiones directas y contienen regiones U3, R y U5. Las LTR generalmente proporcionan funciones fundamentales para la expresión de genes retrovirales (por ejemplo, promoción, iniciación y poliadenuilación de transcritos génicos) y para la replicación viral. La LTR contiene numerosas señales reguladoras que incluyen elementos de control de la transcripción, señales de poliadenilación y secuencias necesarias para la replicación e integración del genoma viral. La LTR viral se divide en tres regiones denominadas U3, R y U5. La región U3 contiene los elementos potenciadores y promotores. La región U5 es la secuencia entre el sitio de unión del cebador y la región R y contiene la secuencia de poliadenilación. La región R (repetición) está flanqueada por las regiones U3 y U5. La LTR se compone de regiones U3, R y U5 y aparece en los extremos 5' y 3' del genoma viral. Adyacente a la LTR 5' hay secuencias necesarias para la transcripción inversa del genoma (el sitio de unión del cebador de tRNA) y para el empaquetamiento eficiente del ARN viral en partículas (el sitio Psi).

25 Como se usa en el presente documento, el término "señal de empaquetamiento" o "secuencia de empaquetamiento" se refiere a secuencias ubicadas dentro del genoma retroviral que se requieren para la inserción del ARN viral en la cápside o partícula viral, véase, por ejemplo, Clever y otros, 1995. J. of Virology, vol. 69, núm. 4; pp. 2101-2109. Varios vectores retrovirales usan la señal de empaquetamiento mínima (también conocida como la secuencia psi [ $\Psi$ ]) necesaria para la encapsidación del genoma viral. Por lo tanto, como se usa en el presente documento, los términos "secuencia de empaquetamiento", "señal de empaquetamiento", "psi" y el símbolo " $\Psi$ " se usan en referencia a la secuencia no codificante requerida para la encapsidación de cadenas de ARN retrovirales durante la formación de partículas virales.

35 En diversas modalidades, los vectores comprenden 5' LTR y/o 3' LTR modificadas. Cualquiera o ambas de las LTR pueden comprender una o más modificaciones que incluyen, sin limitación, una o más deleciones, inserciones o sustituciones. Las modificaciones de la 3' LTR a menudo se realizan para mejorar la seguridad de los sistemas lentivirales o retrovirales al hacer que los virus sean defectuosos en la replicación. Como se usa en el presente documento, el término "defectuoso en la replicación" se refiere a un virus que no puede llevar a cabo una replicación completa y efectiva de modo que no se produzcan viriones infecciosos (por ejemplo, progenie lentiviral con replicación defectuosa). El término "competente en replicación" se refiere a un virus de tipo silvestre o un virus mutante que puede replicarse, de modo que la replicación viral del virus puede producir viriones infecciosos (por ejemplo, progenie lentiviral competente en replicación).

45 Los vectores "autoinactivadores" (SIN) se refieren a vectores defectuosos en la replicación, por ejemplo, vectores retrovirales o lentivirales, en los que la región potenciadora-promotora de LTR (3') derecha, conocida como región U3, ha sido modificada (por ejemplo, por eliminación o sustitución) para evitar la transcripción viral más allá de la primera ronda de replicación viral. Esto se debe a que la región U3 de LTR derecha (3') se usa como molde para la región U3 de LTR izquierda (5') durante la replicación viral y, por lo tanto, la transcripción viral no se puede llevar a cabo sin el promotor potenciador de U3. En una modalidad adicional de la invención, la 3' LTR se modifica de modo que la región U5 se reemplaza, por ejemplo, con una secuencia de poli(A) ideal. Debe señalarse que las modificaciones a las LTR, tales como modificaciones a la 3' LTR, la 5' LTR, o ambas 3' y 5' LTR, también se incluyen en la invención.

55 Se proporciona una mejora de seguridad adicional al reemplazar la región U3 de la 5' LTR con un promotor heterólogo para impulsar la transcripción del genoma viral durante la producción de partículas virales. Los ejemplos de promotores heterólogos que se pueden usar incluyen, por ejemplo, promotores del virus de simio 40 (SV40) (por ejemplo, temprano o tardío), de citomegalovirus (CMV) (por ejemplo, Precoz inmediato), del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV), del virus del sarcoma de Rous (RSV) y del virus del herpes simple (HSV) (de timidina quinasa). Los promotores típicos pueden conducir a altos niveles de transcripción de una manera independiente de Tat. Este reemplazo reduce la posibilidad de recombinación para generar virus competentes en replicación porque no hay una secuencia U3 completa en el sistema de producción de virus. En ciertas modalidades, el promotor heterólogo tiene ventajas adicionales para controlar la manera en que se transcribe el genoma viral. Por ejemplo, el promotor heterólogo puede ser inducible, de modo que la transcripción de todo o parte del genoma viral ocurrirá solo cuando los factores de inducción estén presentes. Los factores de inducción incluyen, entre otros, uno o más compuestos químicos o las condiciones fisiológicas como la temperatura o el pH, en las que se cultivan las células huésped.

65 En algunas modalidades, los vectores virales comprenden un elemento TAR. El término "TAR" se refiere al elemento genético de "respuesta de trans-activación" ubicado en la región R de las LTR lentivirales (por ejemplo, VIH). Este

elemento interactúa con el elemento genético trans-activador lentiviral (tat) para mejorar la replicación viral. Sin embargo, este elemento no se requiere en modalidades en las que la región U3 de la LTR 5' se reemplaza por un promotor heterólogo.

5 La "región R" se refiere a la región dentro de las LTR retrovirales que comienzan al inicio del grupo de protección (es decir, el inicio de la transcripción) y terminan inmediatamente antes del comienzo del segmento de poli A. La región R también se define como flanqueada por las regiones U3 y U5. La región R desempeña un papel durante la transcripción inversa al permitir la transferencia del ADN naciente de un extremo del genoma al otro.

10 Como se usa en el presente documento, el término "elemento FLAP" se refiere a un ácido nucleico cuya secuencia incluye el segmento central de polipurinas y las secuencias de terminación central (cPPT y CTS) de un retrovirus, por ejemplo, VIH-1 o VIH-2. Los elementos FLAP adecuados se describen en la patente de Estados Unidos 6,682,907 y en Zennou, y otros, 2000, Cell, 101:173. Durante la transcripción inversa del VIH-1, la iniciación central del ADN de cadena positiva en el segmento central de polipurinas (cPPT) y la terminación central en la secuencia de terminación central (CTS) conducen a la formación de una estructura de ADN de tres cadenas: el pliegue (flap) de ADN central del VIH-1. Sin desear estar atados por ninguna teoría, el pliegue de ADN puede actuar como un determinante cis-activo de la importación nuclear del genoma lentiviral y/o puede aumentar el título del virus. En ejemplos particulares, las cadenas principales de vectores retrovirales o lentivirales comprenden uno o más elementos FLAP hacia el extremo corriente arriba o hacia el extremo corriente abajo de los genes heterólogos de interés en los vectores. Por ejemplo, en modalidades particulares, un plásmido de transferencia incluye un elemento FLAP. En una modalidad, un vector de la invención comprende un elemento FLAP aislado de VIH-1.

25 En un ejemplo, los vectores de transferencia retrovirales o lentivirales comprenden uno o más elementos de exportación. El término "elemento de exportación" se refiere a un elemento regulador post-transcripcional, que actúa en cis, que regula el transporte de un transcrito de ARN desde el núcleo al citoplasma de una célula. Los ejemplos de elementos de exportación de ARN incluyen, sin limitación, el elemento de respuesta rev (RRE) del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (véase, por ejemplo, Cullen y otros, 1991. J. Virol. 65: 1053; y Cullen y otros, 1991. Cell 58: 423), y el elemento regulador post-transcripcional del virus de la hepatitis B (HPRE). En general, el elemento de exportación de ARN se coloca dentro de la UTR 3' de un gen, y se puede insertar como una o múltiples copias.

30 En modalidades particulares, la expresión de secuencias heterólogas en vectores virales se incrementa mediante la incorporación de elementos reguladores postranscripcionales, sitios de poliadenilación eficientes y, opcionalmente, señales de terminación de la transcripción en los vectores. Una variedad de elementos reguladores postranscripcionales puede aumentar la expresión de un ácido nucleico heterólogo a la proteína, por ejemplo, elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de marmota (WPRE; Zufferey y otros, 1999, J. Virol., 73: 2886); el elemento regulador post-transcripcional presente en el virus de la hepatitis B (HPRE) (Huang y otros, Mol. Cell. Biol., 5:3864); y similares (Liu y otros, 1995, Genes Dev., 9: 1766). En modalidades particulares, los vectores de la invención comprenden un elemento regulador postranscripcional tal como un WPRE o HPRE

40 En modalidades particulares, los vectores de la invención carecen o no comprenden un elemento regulador postranscripcional tal como un WPRE o HPRE porque en algunos casos estos elementos aumentan el riesgo de transformación celular y/o no aumentan sustancial o significativamente la cantidad de transcrito de ARNm o aumentan la estabilidad del ARNm. Por lo tanto, en algunas modalidades, los vectores de la invención carecen o no comprenden un WPRE o HPRE como una medida de seguridad adicional.

45 Los elementos que dirigen la terminación eficiente y la poliadenilación de los transcritos del ácido nucleico heterólogo aumentan la expresión génica heteróloga. Las señales de terminación de la transcripción se encuentran generalmente hacia el extremo corriente abajo de la señal de poliadenilación. En modalidades particulares, los vectores comprenden una secuencia de poliadenilación 3' de un polinucleótido que codifica un polipéptido a expresar. El término "sitio de poliA" o "secuencia de poliA" como se usa en el presente documento denota una secuencia de ADN que dirige tanto la terminación como la poliadenilación del transcrito de ARN naciente por la ARN polimerasa II. Las secuencias de poliadenilación pueden promover la estabilidad del ARNm mediante la adición de una cola de poliA al extremo 3' de la secuencia de codificación y, por lo tanto, contribuir a una mayor eficiencia traduccional. La poliadenilación eficiente del transcrito recombinante es conveniente ya que los transcritos que carecen de una cola de poliA son inestables y se degradan rápidamente. Los ejemplos ilustrativos de señales de poliA que se pueden usar en un vector de la invención incluyen una secuencia de poliA ideal (por ejemplo, AATAAA, ATTAAA, AGTAAA), una secuencia de poliA de la hormona de crecimiento bovina (BGHpA), una secuencia de poliA de  $\beta$ -globina de conejo ( $\beta$ gpa), u otra secuencia de poliA heteróloga o endógena adecuada conocida en la técnica.

60 En varios ejemplos, los vectores de la descripción comprenden un promotor unido operativamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido de CAR o TCR modificado. Los vectores pueden tener una o más LTR, en donde cualquiera de las LTR comprende una o más modificaciones, tales como una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos. Los vectores pueden comprender además uno de más elementos accesorios para aumentar la eficiencia de transducción (por ejemplo, un cPPT/FLAP), empaque viral (por ejemplo, una señal de empaque Psi ( $\Psi$ ), RRE) y/u otros elementos que aumentan la expresión del gen terapéutico (por ejemplo, secuencias de poli(A)), y opcionalmente

65

pueden comprender un WPRE o HPRE. El experto en la materia apreciará que pueden formarse muchas otras modalidades diferentes a partir de las modalidades existentes de la invención.

Una "célula huésped" incluye células transfectadas, infectadas o transducidas *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro* con un vector recombinante o un polinucleótido de la invención. Las células huésped pueden incluir células de empaquetamiento, células productoras y células infectadas con vectores virales. En ejemplos particulares, las células huésped infectadas con un vector viral de la descripción se administran a un sujeto que necesita terapia. En ciertas modalidades, el término "célula objetivo" se usa indistintamente con célula huésped y se refiere a células transfectadas, infectadas o transducidas de un tipo de célula deseado. En las modalidades, la célula objetivo es una célula T.

La producción de partículas virales a gran escala es a menudo necesaria para lograr un título viral razonable. Las partículas virales se producen al transfectar un vector de transferencia en una línea celular de empaquetamiento que comprende genes virales estructurales y/o accesorios, por ejemplo, genes gag, pol, env, tat, rev, vif, vpr, vpu, vpx o nef u otros genes retrovirales.

Como se usa en este documento, el término "vector de empaquetamiento" se refiere a un vector de expresión o vector viral que carece de una señal de empaquetamiento y comprende un polinucleótido que codifica uno, dos, tres, cuatro o más genes estructurales y/o accesorios virales. Típicamente, los vectores de empaquetamiento se incluyen en una célula de empaquetamiento, y se introducen en la célula mediante transfección, transducción o infección. Los expertos en la técnica conocen bien los métodos de transfección, transducción o infección. Se puede introducir un vector de transferencia retroviral/lentiviral de la presente descripción en una línea celular de empaquetamiento, mediante transfección, transducción o infección, para generar una célula o línea celular productora. Los vectores de empaquetamiento de la presente descripción pueden introducirse en células o líneas celulares humanas mediante métodos estándar que incluyen, por ejemplo, transfección con fosfato de calcio, lipofección o electroporación. En algunas modalidades, los vectores de empaquetamiento se introducen en las células junto con un marcador de selección dominante, tal como neomicina, higromicina, puromicina, blastocidina, zeocina, timidina quinasa, DHFR, Gln sintetasa o ADA, seguido de la selección en presencia del fármaco apropiado y el aislamiento de clones. Un gen marcador de selección puede unirse físicamente a genes codificados por el vector de empaquetamiento, por ejemplo, por IRES o péptidos virales autoescindibles.

Las proteínas de la envoltura viral (env) determinan la variedad de células huésped que finalmente pueden ser infectadas y transformadas por los retrovirus recombinantes generados a partir de las líneas celulares. En el caso de los lentivirus, como VIH-1, VIH-2, SIV, FIV y EIV, las proteínas env incluyen gp41 y gp120. Preferentemente, las proteínas env virales expresadas por las células de empaquetamiento de la descripción están codificadas en un vector separado de los genes gag y pol virales, como se ha descrito previamente.

Los ejemplos ilustrativos de genes env derivados de retrovirus que se pueden emplear en la descripción incluyen, sin limitación: envolturas de MLV, envoltura 10A1, BAEV, FeLV-B, RD114, SSV, Ébola, Sendai, FPV (virus de la peste de las aves), y envolturas de virus de la gripe. De manera similar, se pueden utilizar genes que codifican las envolturas de virus de ARN (por ejemplo, familias de virus de ARN de Picornaviridae, Calciviridae, Astroviridae, Togaviridae, Flaviviridae, Coronaviridae, Paramyxoviridae, Rhabdoviridae, Filoviridae, Orthomyxoviridae, Bunyaviridae, Arenaviridae, Reoviridae, Birnaviridae, Retroviridae) así como de virus de ADN (familias de Hepadnaviridae, Circoviridae, Parvoviridae, Papovaviridae, Adenoviridae, Herpesviridae, Poxviridae e Iridoviridae). Los ejemplos representativos incluyen FeLV, VEE, HFVW, WDSV, SFV, Rabia, ALV, BIV, BLV, EBV, CAEV, SNV, ChTLV, STLV, MPMV, SMRV, RAV, FuSV, MH2, AEV, AMV, CT10 y EIAV.

En otros ejemplos, las proteínas de la envoltura para pseudotipar un virus de la presente descripción incluyen, sin limitación, cualquiera de los siguientes virus: Influenza A como H1N1, H1N2, H3N2 y H5N1 (gripe aviar), Influenza B, virus de Influenza C, virus de la Hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis D, virus de la hepatitis E, rotavirus, cualquier virus del grupo del virus Norwalk, adenovirus entéricos, parvovirus, virus de la fiebre del dengue, viruela del mono, mononegavirales, Lyssavirus como el virus de la rabia, virus del murciélago de Lagos, virus de Mokola, virus de Duvenhage, virus de murciélago europeo 1 y 2 y virus de murciélago australiano, efemerovirus, vesiculovirus, virus de estomatitis vesicular (VSV), virus del herpes como el virus del herpes simple tipos 1 y 2, varicela zoster, citomegalovirus, virus de Epstein-Bar (EBV), virus del herpes humano (HHV), virus del herpes humano tipo 6 y 8, virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus del papiloma, virus del gammaherpes murino, arenavirus como el virus de la fiebre hemorrágica argentina, virus de la fiebre hemorrágica boliviana, Virus de la fiebre hemorrágica asociada a Sabia, virus de la fiebre hemorrágica venezolana, virus de la fiebre de Lassa, virus de Machupo, virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), Bunyaviridae como el virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, Hantavirus, virus causante de fiebre hemorrágica con síndrome renal, virus de la fiebre del Valle del Rift, Filoviridae (filovirus), incluida la fiebre hemorrágica del Ébola y la fiebre hemorrágica de Marburgo, Flaviviridae, incluido el virus de la enfermedad del bosque de Kaysanur, el virus de la fiebre hemorrágica Omsk, el virus causante de la encefalitis transmitida por garrapatas y el Paramyxoviridae, como el virus Hendra y el virus Nipah, la variola mayor y la variola menor (viruela), alfavirus como el virus de la encefalitis equina venezolana, el virus de la encefalitis equina del este, el virus de la encefalitis equina del oeste, el coronavirus asociado al SARS (SARS-CoV), el virus del Nilo Occidental, cualquier virus causante de encefalitis.

En un ejemplo, la descripción proporciona células de empaquetamiento que producen retrovirus recombinantes, por ejemplo, lentivirus, pseudotipados con la glucoproteína VSV-G.

Los términos "pseudotipo" o "pseudotipado", como se usan en el presente documento, se refieren a un virus cuyas proteínas de la envoltura viral se han sustituido con las de otro virus que posee características preferibles. Por ejemplo, el VIH se puede pseudotipar con proteínas de la envoltura, proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), lo que permite que el VIH infecte una gama más amplia de células porque las proteínas de la envoltura del VIH (codificadas por el gen env) normalmente dirigen el virus a las células presentadoras CD4+. En una modalidad preferida de la invención, las proteínas de la envoltura lentivirales se pseudotipan con VSV-G. En una modalidad, la descripción proporciona células de empaquetamiento que producen retrovirus recombinantes, por ejemplo, lentivirus, pseudotipados con la glucoproteína de la envoltura VSV-G.

Como se usa en el presente documento, el término "líneas celulares de empaquetamiento" se usa en referencia a líneas celulares que no contienen una señal de empaquetamiento, pero que expresan de manera estable o transitoria proteínas estructurales virales y enzimas de replicación (por ejemplo, gag, pol y env) que son necesarias para el correcto empaquetamiento de partículas virales. Se puede emplear cualquier línea celular adecuada para preparar las células de empaquetamiento de la descripción. En general, las células son células de mamífero. En un ejemplo particular, las células utilizadas para producir la línea celular de empaquetamiento son células humanas. Las líneas celulares adecuadas que pueden usarse incluyen, por ejemplo, células CHO, células BHK, células MDCK, células C3H 10T1/2, células FLY, células Psi-2, células BOSC 23, células PA317, células WEHI, células COS, células BSC 1, células BSC 40, células BMT 10, células VERO, células W138, células MRC5, células A549, células HT1080, células 293, células 293T, células B-50, células 3T3, células NIH3T3, células HepG2, células Saos-2, Células Huh7, células HeLa, células W163, células 211 y células 211A. En un ejemplo preferido, las células de empaquetamiento son células 293, células 293T o células A549.

Como se usa en el presente documento, el término "línea celular productora" se refiere a una línea celular que es capaz de producir partículas retrovirales recombinantes, que comprende una línea celular de empaquetamiento y una construcción de vector de transferencia que comprende una señal de empaquetamiento. La producción de partículas virales infecciosas y soluciones madre virales se puede llevar a cabo mediante el uso de técnicas convencionales. Los métodos para preparar soluciones madre virales son conocidos en la técnica y se ilustran, por ejemplo, en Y. Soneoka y otros (1995) Nucl. Acids Res. 23:628-633, y N.R. Landau y otros (1992) J. Virol. 66:5110-5113. Las partículas virales infecciosas pueden recogerse de las células de empaquetamiento mediante el uso de técnicas convencionales. Por ejemplo, las partículas infecciosas se pueden recoger por lisis celular, o la colección del sobrenadante del cultivo celular, como se conoce en la técnica. Opcionalmente, las partículas virales recogidas pueden purificarse si se desea. Las técnicas de purificación adecuadas son bien conocidas por los expertos en la materia.

El suministro de uno o más genes u otra secuencia de polinucleótidos mediante el uso de un vector retroviral o lentiviral mediante infección viral en lugar de mediante transfección se denomina "transducción". En un ejemplo, los vectores retrovirales se transducen a una célula a través de la infección y la integración de provirus. En ciertos ejemplos, una célula objetivo, por ejemplo, una célula T, es "transducida" si comprende un gen u otra secuencia de polinucleótidos suministrados a la célula por infección mediante el uso de un vector viral o retroviral. En un ejemplo particular, una célula transducida comprende uno o más genes u otras secuencias polinucleotídicas administradas por un vector retroviral o lentiviral en su genoma celular.

En un ejemplo particular, las células huésped transducidas con un vector viral de la descripción que expresa uno o más polipéptidos, se administran a un sujeto para tratar y/o prevenir una neoplasia maligna de células B. Se pueden encontrar otros métodos relacionados con el uso de vectores virales en terapia génica, que pueden utilizarse de acuerdo con ciertos ejemplos, por ejemplo, en Kay, M.A. (1997) Chest 111 (6 Supp.): 138S-142S; Ferry, N. y Heard, J.M. (1998) Hum. Gene Ther. 9: 1975-81; Shiratory, Y. y otros (1999) Liver 19: 265-74; Oka, K. y otros (2000) Curr. Opin. Lipidol. 11:179-86; Thule, P. M. y Liu, J. M. (2000) Gene Ther. 7:1744-52; Yang, N. S. (1992) Crit. Rev. Biotechnol. 12:335-56; Alt, M. (1995) J. Hepatol. 23:746-58; Brody, S. L. y Crystal, R. G. (1994) Ann. N.Y. Acad. Sci. 716:90-101; Strayer, D. S. (1999) Expert Opin. Investig. Drugs 8:2159-2172; Smith-Arica, J. R. y Bartlett, J. S. (2001) Curr. Cardiol. Rep. 3:43-49; y Lee, H. C. y otros (2000) Nature 408:483-8.

#### H. Composiciones y formulaciones

Las composiciones contempladas en el presente documento pueden comprender uno o más polipéptidos, polinucleótidos, vectores que los comprenden y composiciones de células T, como se contempla en el presente documento. Las composiciones incluyen, sin limitación, composiciones farmacéuticas. Una "composición farmacéutica" se refiere a una composición formulada en soluciones farmacéuticamente aceptables o fisiológicamente aceptables para la administración a una célula o un animal, ya sea sola o en combinación con una o más de otras modalidades de terapia. También se entenderá que, si se desea, las composiciones de la descripción también se pueden administrar en combinación con otros agentes, tales como, por ejemplo, citocinas, factores de crecimiento, hormonas, moléculas pequeñas, quimioterapéuticos, profármacos, fármacos, anticuerpos, u otros diversos agentes farmacéuticamente activos. Prácticamente no hay límite para otros componentes que también pueden incluirse en las

composiciones, siempre que los agentes adicionales no afecten negativamente la capacidad de la composición para suministrar la terapia prevista.

5 La frase "farmacéuticamente aceptable" se emplea en el presente documento para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que, dentro del alcance del buen juicio médico, son adecuados para usar en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable.

10 Como se usa en el presente documento, "vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye, sin limitación, cualquier adyuvante, vehículo, excipiente, deslizante, agente edulcorante, diluyente, conservante, tinte/colorante, potenciador del sabor, tensioactivo, agente humectante, agente dispersante, agente de suspensión, estabilizador, agente isotónico, disolvente, surfactante o emulsionante que ha sido aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos como aceptable para usar en seres humanos o animales domésticos. Los vehículos farmacéuticamente aceptables ilustrativos incluyen, sin limitación, azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto; malta; gelatina; talco; manteca de cacao, ceras, grasas animales y vegetales, parafinas, siliconas, bentonitas, ácido silícico, óxido de zinc; aceites, tales como aceite de maní, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles, tales como propilenglicol; polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tamponantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido alginico; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; soluciones tampón de fosfato; y cualquier otra sustancia compatible empleada en formulaciones farmacéuticas.

25 En ejemplos particulares, las composiciones de la presente descripción comprenden una cantidad de células T modificadas producidas por los métodos contemplados en el presente documento. En general, se puede afirmar que una composición farmacéutica que comprende las células T producidas por los métodos contemplados en el presente documento se puede administrar a una dosis de  $10^2$  a  $10^{10}$  células/kg de peso corporal, preferentemente  $10^5$  a  $10^6$  células/kg de peso corporal, incluidos todos los valores enteros dentro de esos intervalos. El número de células dependerá del uso final para el que está destinada la composición, al igual que el tipo de células incluidas en el mismo.

30 Para los usos proporcionados en el presente documento, las células están generalmente en un volumen de un litro o menos, puede ser de 500 ml o menos, incluso de 250 ml o 100 ml o menos. Por lo tanto, la densidad de las células deseadas es típicamente mayor que  $10^6$  células/ml y generalmente es mayor que  $10^7$  células/ml, generalmente  $10^8$  células/ml o mayor. La cantidad clínicamente relevante de células inmunitarias puede distribuirse en múltiples infusiones que acumulativamente igualan o exceden  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$  o  $10^{12}$  células. Las células pueden ser alogénicas, singénicas, xenogénicas o autólogas para el paciente sometido a terapia. Si se desea, el tratamiento también puede incluir la administración de mitógenos (por ejemplo, PHA) o linfocinas, citocinas y/o quimiocinas (por ejemplo, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-7, IL-15, IL-12, TNF-alfa, IL-18 y TNF-beta, GM-CSF, IL-4, IL-13, Flt3-L, RANTES, MIP1 $\alpha$ , etc.) como se describe en este documento para mejorar el injerto y la función de las células T infundidas.

40 Generalmente, las composiciones que comprenden las células activadas y expandidas como se describe en el presente documento pueden utilizarse en el tratamiento y la prevención de enfermedades que surgen en individuos inmunodeprimidos. En particular, las composiciones que comprenden las células T modificadas producidas por los métodos contemplados en el presente documento se usan en el tratamiento del cáncer. Las células T modificadas de la presente descripción pueden administrarse solas o como una composición farmacéutica en combinación con vehículos, diluyentes, excipientes y/o con otros componentes tales como IL-2, IL-7 y/o IL-15 u otras citocinas o poblaciones celulares. En ejemplos particulares, las composiciones farmacéuticas contempladas en el presente documento comprenden una cantidad de células T genéticamente modificadas, en combinación con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéutica o fisiológicamente aceptables.

50 Las composiciones farmacéuticas que comprenden las células T modificadas contempladas en el presente documento pueden comprender además tampones tales como solución salina tamponada neutra, solución salina tamponada con fosfato y similares; carbohidratos tales como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos tales como glicina; antioxidantes; agentes quelantes tales como EDTA o glutatión; adyuvantes (por ejemplo, hidróxido de aluminio); y conservantes. Las composiciones de la presente descripción se formulan preferentemente para administración parenteral, por ejemplo, administración intravascular (intravenosa o intraarterial), intraperitoneal o intramuscular.

60 En un ejemplo, las composiciones se administran por vía intravenosa.

Las composiciones farmacéuticas líquidas, ya sean soluciones, suspensiones u otra forma similar, pueden incluir uno o más de los siguientes: DMSO, diluyentes estériles tales como agua para inyección, solución salina, preferentemente solución salina fisiológica, solución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites fijos tales como mono o diglicéridos sintéticos que pueden servir como disolvente o medio de suspensión, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabeno; antioxidantes tales como ácido

ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad como cloruro de sodio o dextrosa.

5 En ejemplos particulares, las células se congelan en medio criogénico que puede infundirse, 50 % de plasmalyte y 50 % de Cryostor 10; 50/40/10 (XVIVO/HABS/DMSO); o Cryostor 10.

La preparación parenteral puede encerrarse en bolsas de vidrio o plástico, ampollas, jeringas desechables o frascos de dosis múltiples. Una composición farmacéutica inyectable es preferentemente estéril.

10 En un ejemplo particular, las composiciones contempladas en el presente documento comprenden una cantidad eficaz de una composición de células T modificadas y expandidas, sola o en combinación con uno o más agentes terapéuticos. Por lo tanto, las composiciones de células T pueden administrarse solas o en combinación con otros tratamientos conocidos contra el cáncer, tales como radioterapia, quimioterapia, trasplante, inmunoterapia, terapia hormonal, terapia fotodinámica, etc. Las composiciones también pueden administrarse en combinación con  
15 antibióticos. Dichos agentes terapéuticos pueden aceptarse en la técnica como un tratamiento estándar para un estado patológico particular como se describe en este documento, tal como un cáncer particular. Ejemplos de agentes terapéuticos contemplados incluyen citocinas, factores de crecimiento, esteroides, AINE, DMARD, antiinflamatorios, quimioterapéuticos, radioterapéuticos, anticuerpos terapéuticos u otros agentes activos y auxiliares.

20 En ciertos ejemplos, las composiciones que comprenden células T contempladas en el presente documento pueden administrarse junto con cualquier número de agentes quimioterapéuticos. Ejemplos ilustrativos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN™); alquil sulfonatos  
25 tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas, que incluyen altretamina, trietilenomelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilolomelamina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalan, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-  
35 mercaptopurina, tiampurina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxiluridina, encicitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico tal como ácido frofínico; aceglatona; aldofosfamida glucósido; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquna; elformitina; acetato de eliptinio; etoglucid; nitrato de galio; hidroxirea; lentinan; lonidamina; mitogazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; phenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK®; razoxano; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquna; 2,2',2"-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; mannomicina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y doxetaxel (TAXOTERE®, Rhne-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido, ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilomina (DMFO); derivados del ácido retinoico como Targretin™ (bexaroteno), Panretin™ (alitretinoína); ONTAK™ (denileukin diftitox); esperamicinas; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. También se incluyen en esta definición los agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre tumores como los antiestrógenos, que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de la aromatasa, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y sales, ácidos o derivados  
55 farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Se puede usar una variedad de otros agentes terapéuticos junto con las composiciones descritas en el presente documento. En un ejemplo, la composición que comprende células T se administra con un agente antiinflamatorio. Los agentes o fármacos antiinflamatorios incluyen, sin limitación, esteroides y glucocorticoides (que incluyen  
60 betametasona, budesonida, dexametasona, acetato de hidrocortisona, hidrocortisona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, triamcinolona), medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) que incluyen aspirina, ibuprofeno, naproxeno, metotrexato, sulfasalazina, leflunomida, medicamentos anti-TNF, ciclofosfamida y micofenolato.

65 Otros AINE ilustrativos se eligen del grupo que consiste en ibuprofeno, naproxeno, naproxeno sódico, inhibidores de Cox-2 como VIOXX® (rofecoxib) y CELEBREX® (celecoxib) y sialilatos. Los analgésicos ilustrativos se eligen del

grupo que consiste en paracetamol, oxicodeona, tramadol de hidrocloreto de proporfeno. Los glucocorticoides ilustrativos se eligen del grupo que consiste en cortisona, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona o prednisona. Los modificadores de la respuesta biológica ilustrativos incluyen moléculas dirigidas contra marcadores de la superficie celular (por ejemplo, CD4, CD5, etc.), inhibidores de citocinas, como los antagonistas del TNF (por ejemplo, Etanercept (ENBREL®), adalimumab (HUMIRA®) e infliximab (REMICADE®), inhibidores de quimiocinas e inhibidores de moléculas de adhesión. Los modificadores de la respuesta biológica incluyen anticuerpos monoclonales, así como formas recombinantes de moléculas. Los DMARD ilustrativos incluyen azatioprina, ciclofosfamida, ciclosporina, metotrexato, penicilamina, leflunomida, sulfasalazina, hidroxiquina, oro (oral (auranofin) e intramuscular) y minociclina.

Los ejemplos ilustrativos de anticuerpos terapéuticos adecuados para la combinación con las células T modificadas con CAR contempladas en el presente documento incluyen, sin limitación, abagovomab, adecatumumab, afutuzumab, alemtuzumab, altumomab, amatuximab, anatumomab, arcitumomab, bavituximab, bectumomab, bevacizumab, bivatumumab, blinatumomab, brentuximab, cantuzumab, catumaxomab, cetuximab, citatumumab, cixutumumab, clivatuzumab, conatumumab, daratumumab, drozitumab, duligotumab, dusigitumab, detumomab, dacetuzumab, dalotuzumab, ecomeximab, elotuzumab, ensituximab, ertumaxomab, etaracizumab, farietuzumab, ficlatuzumab, figitumumab, flanvotumab, futuximab, ganitumab, gemtuzumab, girentuximab, glembatumumab, ibritumomab, igovomab, imgatuzumab, indatuximab, inotuzumab, intetumumab, ipilimumab, iratumumab, labetuzumab, lexatumumab, lintuzumab, lorvotuzumab, lucatumumab, mapatumumab, matuzumab, milatumumab, minretumomab, mitumomab, moxetumomab, namatumab, naptumomab, necitumumab, nimotuzumab, nofetumomab, ocaratuzumab, ofatumumab, olaratumab, onartuzumab, oportuzumab, oregovomab, panitumumab, parsatumumab, patritumab, pentumomab, pertuzumab, pintumomab, pritumumab, racotumomab, radretumab, rilotumumab, rituximab, robatumumab, satumomab, sibrotuzumab, siltuximab, simtuzumab, solitomab, tacatumumab, taplitumomab, tenatumomab, teprotumumab, tigatuzumab, tositumomab, trastuzumab, tucotuzumab, ublituximab, veltuzumab, vorsetuzumab, votumumab, zalutumumab, CC49 y 3F8.

En ciertos ejemplos, las composiciones descritas en el presente documento se administran junto con una citocina. Por "citocina", como se usa en el presente documento, se entiende un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de tales citocinas son linfocinas, monocinas, quimiocinas, por ejemplo, RANTES, MIP1a y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citocinas se incluyen las hormonas de crecimiento tales como la hormona de crecimiento humana, la hormona de crecimiento humana N-metil y la hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; pro-relaxina; hormonas glicoproteicas como hormona estimulante de folículos (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral alfa y beta; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento vascular endotelial; integrina; trombospoietina (TPO); factores de crecimiento nervioso como NGF-beta; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF-alfa y TGF-beta; factor de crecimiento similar a la insulina-I y -II; eritropoietina (EPO); factores osteoinductores; interferones tales como interferón alfa, beta y gamma; factores estimulantes de colonias (CSF) tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos y macrófagos (GM-CSF); y CSF de granulocitos (G-CSF); interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-1 alfa, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-15, IL-21, un factor de necrosis tumoral tal como TNF-alfa o TNF-beta; y otros factores polipeptídicos que incluyen LIF y el ligando de kit (KL). Como se usa en el presente documento, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa.

#### I. Células objetivo y antígenos

La presente descripción contempla, en parte, plataformas de producción de células para producir células efectoras inmunitarias modificadas genéticamente redirigidas a una célula objetivo, por ejemplo, una célula tumoral o cancerosa, y que comprenden receptores de células T modificados o CAR que tienen un dominio de unión que se une a antígenos objetivo en las células. Las células cancerosas también pueden propagarse a otras partes del cuerpo a través de los sistemas sanguíneo y linfático. Existen varios tipos principales de cáncer. El carcinoma es un cáncer que comienza en la piel o en los tejidos que recubren o cubren los órganos internos. El sarcoma es un cáncer que comienza en huesos, cartílago, grasa, músculo, vasos sanguíneos u otro tejido conectivo o de soporte. La leucemia es un cáncer que comienza en el tejido formador de sangre, como la médula ósea, y hace que se produzcan grandes cantidades de células sanguíneas anormales que ingresan a la sangre. El linfoma y el mieloma múltiple son cánceres que comienzan en las células del sistema inmunitario. Los cánceres del sistema nervioso central son cánceres que comienzan en los tejidos del cerebro y la médula espinal.

En una modalidad, la célula objetivo expresa un antígeno, por ejemplo, el antígeno objetivo, que no se encuentra sustancialmente en la superficie de otras células normales (deseadas). En una modalidad, la célula objetivo es una célula parenquimatosa pancreática, una célula del conducto pancreático, una célula hepática, una célula del músculo cardíaco, una célula del músculo esquelético, un osteoblasto, un mioblasto esquelético, una neurona, una célula endotelial vascular, una célula pigmentaria, una célula de músculo liso, una célula glial, un adipocito, una célula ósea, un condrocito, una célula de islote pancreático, una célula del SNC, una célula del SNP, una célula hepática, una

célula adiposa, una célula renal, una célula pulmonar, una célula de la piel, una célula de ovario, una célula folicular, una célula epitelial, una célula inmunitaria o una célula endotelial.

5 En ciertas modalidades, la célula objetivo es parte de un tejido pancreático, tejido neural, tejido cardíaco, médula ósea, tejido muscular, tejido óseo, tejido de la piel, tejido hepático, folículos pilosos, tejido vascular, tejido adiposo, tejido pulmonar y tejido renal.

10 En una modalidad particular, la célula objetivo es una célula tumoral. En otra modalidad particular, la célula objetivo es una célula cancerosa, tal como una célula en un paciente con cáncer. Las células ilustrativas que pueden eliminarse con los métodos descritos incluyen células de los siguientes tumores: un tumor líquido como una leucemia, que incluye leucemia aguda (como leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda y mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia), leucemias crónicas (como leucemia mielocítica crónica (granulocítica) y leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de las cadenas pesadas).

15 En otra modalidad, la célula es una célula de un tumor sólido, tal como sarcomas y carcinomas, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico y otros sarcomas, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rhabdomiomasarcoma, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma (por ejemplo, adenocarcinoma de páncreas, colon, ovario, pulmón, mama, estómago, próstata, cuello uterino o esófago), carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de las vías biliares, coriocarcinoma, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, carcinoma de vejiga, tumores del SNC (tales como glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, menangioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma).

20 En una modalidad, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en: El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en tumor de Wilms, sarcoma de Ewing, un tumor neuroendocrino, un glioblastoma, un neuroblastoma, un melanoma, cáncer de piel, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer renal, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer biliar, cáncer de cuello uterino, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma medular de tiroides, cáncer de ovario, glioma, linfoma, leucemia, mieloma, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin y cáncer de vejiga urinaria.

25 En una modalidad, la célula objetivo es una célula maligna del hígado, páncreas, pulmón, mama, vejiga, cerebro, hueso, tiroides, riñón, piel y sistema hematopoyético. En otra modalidad, la célula objetivo es una célula en un cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de hueso, cáncer de tiroides, cáncer de riñón, cáncer de piel o cáncer hematológico.

30 En una modalidad, el antígeno objetivo es un epítipo del receptor alfa de folato, 5T4, integrina  $\alpha_v\beta_6$ , BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, familia de EGFR que incluye ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetal, FR $\alpha$ , GD2, GD3, 'Glypican-3 (GPC3), HLA-A1 + MAGE1, HLA-A2 + MAGE1, HLA-A3 + MAGE1, HLA-A1 + NY-ESO-1, HLA-A2 + NY-ESO-1, HLA-A3 + NY-ESO-1, IL-11R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$  2, Lambda, Lewis-Y, Kappa, Mesotelina, Mucl, Muc16, NCAM, Ligandos de NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, Survivina, TAG72, TEM o VEGFR2.

35 J. Métodos terapéuticos

40 Las células T modificadas producidas por los métodos contemplados en el presente documento proporcionan una inmunoterapia adoptiva mejorada para usar en el tratamiento de diversas afecciones que incluyen, sin limitación, cáncer, enfermedad infecciosa, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria e inmunodeficiencia. En ejemplos particulares, la especificidad de una célula T primaria se redirige a las células tumorales o cancerosas modificando genéticamente la célula T primaria con un CAR o TCR modificado contemplado en el presente documento. En un ejemplo, la presente descripción incluye un tipo de terapia celular en la que las células T se modifican para expresar un CAR o TCR modificado que se dirige a las células cancerosas que expresan un antígeno objetivo, y la célula T modificada es infundida a un receptor que lo necesite. La célula infundida puede matar células tumorales en el receptor. A diferencia de las terapias con anticuerpos, las células T modificadas con CAR o TCR modificados pueden replicarse *in vivo*; lo que contribuye así a la persistencia a largo plazo que puede conducir a una terapia sostenida contra el cáncer.

45 En un ejemplo, las células T con CAR y TCR modificados de la invención pueden experimentar una sólida expansión de células T *in vivo* y pueden persistir durante un período de tiempo prolongado. En otro ejemplo, las células T con

CAR o TCR modificados de la invención evolucionan a células T de memoria específica que pueden reactivarse para inhibir cualquier formación o crecimiento tumoral adicional.

5 En ejemplos particulares, las composiciones que comprenden una célula efectora inmunitaria modificada genéticamente con un vector que comprende un promotor unido operativamente a un polinucleótido que codifica un CAR se usan en el tratamiento de tumores o cánceres sólidos que incluyen, sin limitación, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de huesos, cáncer de tiroides, cáncer de riñón o cáncer de piel.

10 En ejemplos particulares, las composiciones que comprenden una célula efectora inmunitaria modificada genéticamente con un vector que comprende un promotor unido operativamente a un polinucleótido que codifica un CAR o TCR modificado que comprende un dominio de unión específico de un antígeno que se une a un epítipo de PSCA o MUC1 se usan en el tratamiento de varios tipos de cáncer, que incluyen, sin limitación, pancreático, de vejiga y de pulmón.

15 En ejemplos particulares, las composiciones que comprenden una célula efectora inmunitaria modificada genéticamente con un vector que comprende un promotor unido operativamente a un polinucleótido que codifica un CAR o TCR modificado se usan en el tratamiento de tumores líquidos, que incluyen, sin limitación, una leucemia, que incluye leucemia aguda (por ejemplo, ALL, AML y mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia), leucemias crónicas (por ejemplo, CLL, SLL, CML, HCL), policitemia vera, linfoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom y enfermedad de las cadenas pesadas.

20 En ejemplos particulares, las composiciones que comprenden una célula efectora inmunitaria modificada genéticamente con un vector que comprende un promotor unido operativamente a un polinucleótido que codifica un CAR o TCR modificado se usan en el tratamiento de neoplasias malignas de células B, que incluyen, sin limitación, mieloma múltiple (MM), linfoma no Hodgkin (NHL) y leucemia linfocítica crónica (CLL).

25 El mieloma múltiple es una neoplasia maligna de células B de la morfología de células plasmáticas maduras caracterizada por la transformación neoplásica de un solo clon de este tipo de células. Estas células plasmáticas proliferan en la BM y pueden invadir el hueso adyacente y, a veces, la sangre. Las formas variantes de mieloma múltiple incluyen mieloma múltiple sintomático, mieloma múltiple asintomático, leucemia de células plasmáticas, mieloma no secretor, mieloma IgD, mieloma osteosclerótico, plasmacitoma óseo solitario y plasmacitoma extramedular (ver, por ejemplo, Braunwald, y otros (Eds), Harrison's Principles of Internal Medicine, 15ª edición (McGraw-Hill 2001)).

30 El linfoma no Hodgkin abarca un gran grupo de cánceres de linfocitos (glóbulos blancos). Los linfomas no Hodgkin pueden ocurrir a cualquier edad y a menudo están marcados por ganglios linfáticos que son más grandes de lo normal, fiebre y pérdida de peso. Existen muchos tipos diferentes de linfoma no Hodgkin. Por ejemplo, el linfoma no Hodgkin puede dividirse en tipos agresivos (de crecimiento rápido) e indolentes (de crecimiento lento). Aunque los linfomas no Hodgkin pueden derivarse de células B y células T, como se usa en el presente documento, el término "linfoma no Hodgkin" y "linfoma no Hodgkin de células B" se usan indistintamente. Los linfomas no Hodgkin de células B (LNH) incluyen el linfoma de Burkitt, leucemia linfocítica crónica/linfoma linfocítico pequeño (CLL/SLL), linfoma difuso de células B grandes, linfoma folicular, linfoma inmunoblástico de células grandes, linfoma linfoblástico de precursores B y linfoma de células del manto. Los linfomas que ocurren después del trasplante de médula ósea o de células madre suelen ser linfomas no Hodgkin de células B.

35 La leucemia linfocítica crónica (CLL) es un cáncer indolente (de crecimiento lento) que causa un aumento lento en los glóbulos blancos inmaduros denominados linfocitos B, o células B. Las células cancerosas se diseminan a través de la sangre y la médula ósea, y también pueden afectar los ganglios linfáticos u otros órganos como el hígado y el bazo. La CLL eventualmente hace que la médula ósea falle. A veces, en etapas posteriores de la enfermedad, la enfermedad se denomina linfoma linfocítico pequeño.

40 En ejemplos particulares, se proporcionan métodos que comprenden administrar una cantidad con eficacia terapéutica de células T modificadas contempladas en el presente documento o una composición que comprende las mismas, a un paciente que lo necesite, solas o en combinación con uno o más agentes terapéuticos. En ciertos ejemplos, las células de la descripción se usan en el tratamiento de pacientes en riesgo de desarrollar un cáncer. Por lo tanto, la presente descripción proporciona métodos para el tratamiento o la prevención de un cáncer que comprende administrar a un sujeto que lo necesita, una cantidad con eficacia terapéutica de las células T modificadas de la descripción.

45 En un ejemplo, un método para tratar un cáncer en un sujeto que lo necesita comprende administrar una cantidad eficaz, por ejemplo, una cantidad con eficacia terapéutica de una composición que comprende células efectoras inmunitarias modificadas genéticamente contempladas en el presente documento. La cantidad y la frecuencia de administración estarán determinadas por factores tales como la afección del paciente y el tipo y la gravedad de la enfermedad del paciente, aunque los ensayos clínicos pueden determinar las dosis apropiadas.

5 En un ejemplo, la cantidad de células T modificadas en la composición administrada a un sujeto es al menos  $0,1 \times 10^7$  células T modificadas/m<sup>2</sup>, al menos  $0,5 \times 10^7$  células T modificadas/m<sup>2</sup>, al menos  $1 \times 10^7$  células T modificadas/m<sup>2</sup>, al menos  $5 \times 10^7$  células T modificadas/m<sup>2</sup>, al menos  $0,1 \times 10^8$  células T modificadas/m<sup>2</sup>, al menos  $0,5 \times 10^8$  células T modificadas/m<sup>2</sup>, al menos  $1 \times 10^8$  células T modificadas/m<sup>2</sup>, al menos  $5 \times 10^8$  células T modificadas/m<sup>2</sup>, o al menos  $1 \times 10^9$  células T modificadas/m<sup>2</sup>, o cualquier cantidad intermedia de células T modificadas.

10 La cantidad de células T modificadas administradas a un sujeto a menudo es solo un subconjunto del número de células totales administradas al sujeto. En un ejemplo particular, al sujeto se le administran al menos  $0,1 \times 10^7$  células T totales, al menos  $0,5 \times 10^7$  células T totales, al menos  $1 \times 10^7$  células T totales, al menos  $5 \times 10^7$  células T totales, al menos  $0,1 \times 10^8$  células T totales, al menos  $0,5 \times 10^8$  células T totales, al menos  $1 \times 10^8$  células T totales, al menos  $5 \times 10^8$  células T totales, al menos  $0,1 \times 10^9$  células T totales, al menos  $0,5 \times 10^9$  células T totales, al menos  $1 \times 10^9$  células T totales, al menos  $5 \times 10^9$  células T totales, o al menos  $0,1 \times 10^{10}$  células T totales o cualquier cantidad intermedia de células T.

15 Un experto en la técnica reconocerá que pueden requerirse múltiples administraciones de las composiciones de la descripción para efectuar la terapia deseada. Por ejemplo, una composición puede administrarse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más veces durante un período de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, 5 años, 10 años o más.

20 En ciertos ejemplos, puede ser conveniente administrar células T activadas a un sujeto y después volver a extraer sangre (o realizar una aféresis), activar las células T a partir de ellas de acuerdo con la presente invención y reinfundir al paciente con estas células T activadas y expandidas. Este proceso puede llevarse a cabo varias veces cada pocas semanas. En ciertos ejemplos, las células T pueden activarse a partir de extracciones de sangre de 10 cc a 400 cc. En ciertos ejemplos, las células T se activan a partir de extracciones de sangre de 20 cc, 30 cc, 40 cc, 50 cc, 60 cc, 25 70 cc, 80 cc, 90 cc, 100 cc, 150 cc, 200 cc, 250 cc, 300 cc, 350 cc o 400 cc o más. Sin estar limitados a la teoría, el uso de este protocolo de extracción de sangre múltiple/reinfusión múltiple puede servir para seleccionar ciertas poblaciones de células T.

30 La administración de las composiciones contempladas en el presente documento puede llevarse a cabo de cualquier manera conveniente, que incluye por inhalación de aerosol, inyección, ingestión, transfusión, implante o trasplante. En un ejemplo preferido, las composiciones se administran por vía parenteral. Las frases "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral" tal como se usan en el presente documento se refieren a modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, generalmente mediante inyección, e incluyen, sin limitación, inyección e infusión intravascular, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intratumoral, 35 intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal. En un ejemplo, las composiciones contempladas en el presente documento se administran a un sujeto mediante inyección directa en un tumor, ganglio linfático o sitio de infección.

40 En un ejemplo, a un sujeto que lo necesita se le administra una cantidad eficaz de una composición para aumentar la respuesta inmunitaria celular a un cáncer en el sujeto. La respuesta inmunitaria puede incluir respuestas inmunitarias celulares mediadas por células T citotóxicas capaces de matar células infectadas, células T reguladoras y respuestas de células T auxiliares. También se pueden inducir respuestas inmunitarias humorales, mediadas principalmente por células T auxiliares capaces de activar las células B, lo que conduce a la producción de anticuerpos. Se puede usar una variedad de técnicas para analizar el tipo de respuestas inmunitarias inducidas por las composiciones de la presente descripción, que están bien descritas en la técnica; por ejemplo, Current Protocols in Immunology, editado 45 por: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober (2001) John Wiley & Sons, NY, Nueva York.

50 En el caso de la muerte mediada por células T, la unión CAR-ligando inicia la señalización de CAR a la célula T, lo que resulta en la activación de una variedad de vías de señalización de las células T que inducen a la célula T a producir o liberar proteínas capaces de inducir apoptosis de las células objetivo por varios mecanismos. Estos mecanismos mediados por células T incluyen (sin limitación) la transferencia de gránulos citotóxicos intracelulares de la célula T a la célula objetivo, la secreción de células T de citocinas proinflamatorias que pueden inducir la muerte de las células objetivo directamente (o indirectamente a través del reclutamiento de otras células efectoras asesinas), y 55 una regulación positiva de los ligandos de receptores de la muerte (por ejemplo, FasL) en la superficie de las células T que inducen la apoptosis de las células objetivo después de la unión a su receptor de muerte correspondiente (por ejemplo, Fas) en la célula objetivo.

60 En un ejemplo, la descripción proporciona un método para tratar a un sujeto diagnosticado con un cáncer, que comprende retirar células efectoras inmunitarias del sujeto, modificar genéticamente dichas células efectoras inmunitarias con un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un CAR o TCR modificado como se contempla en el presente documento, para producir así una población de células efectoras inmunitarias modificadas, y administrar la población de células efectoras inmunitarias modificadas al mismo sujeto. En un ejemplo preferido, las células efectoras inmunitarias comprenden células T.

65

En ciertos ejemplos, la presente descripción también proporciona métodos para estimular una respuesta inmunomoduladora mediada por células efectoras inmunitarias a una población de células objetivo en un sujeto, que comprende las etapas de administrar al sujeto una población de células efectoras inmunitarias que expresan una construcción de ácido nucleico que codifica una molécula de TCR modificado o CAR.

Los métodos para administrar las composiciones celulares descritas en el presente documento incluyen cualquier método que sea eficaz para dar como resultado la reintroducción de células efectoras inmunitarias modificadas genéticamente *ex vivo* que expresen directamente un CAR o TCR modificado en el sujeto o la reintroducción de los progenitores genéticamente modificados de las células efectoras inmunitarias que al introducirse en un sujeto se diferencian en células efectoras inmunitarias maduras que expresan el CAR o TCR modificado. Un método comprende transducir células T de sangre periférica *ex vivo* con una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la invención y devolver las células transducidas al sujeto.

Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de claridad para su comprensión, será evidente para un experto en la técnica a la luz de las enseñanzas de esta invención que pueden hacerse ciertos cambios y modificaciones a la misma. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente una variedad de parámetros no críticos que podrían modificarse o cambiarse para producir resultados esencialmente similares.

## Ejemplos

Las terapias celulares adoptivas (ACT) que usan células T autólogas diseñadas con receptores de antígeno quiméricos (CAR) aún se ven desafiadas por la falta de un proceso de producción simple y robusto. Debido a la complejidad inherente del cultivo de células vivas y la variabilidad de paciente a paciente, es importante desarrollar métodos que sean eficientes, repetibles y escalables. Además, el desarrollo de un procesamiento en un sistema cerrado para la ACT será importante para transformar la ACT en un tratamiento estándar para un gran número de pacientes.

Actualmente, los métodos de producción de células T existentes incluyen varias etapas complejas para el aislamiento, la activación, transducción y expansión de las células T CAR. En contraste, los presentes inventores usaron un modelo de investigación a pequeña escala para desarrollar una plataforma de producción de células T de sistema cerrado simple, robusta, bien caracterizada, flexible, que se transfirió al proceso de producción con cGMP clínicas a gran escala para células T CAR modificadas.

La producción logró niveles de duplicación de la población de 6,75 (+/- 1,5) como promedio en 10 días. Las eficiencias de transducción promedio fueron del 65,3 % (+/- 12,4 %). La pureza del cultivo fue consistentemente > 98 % de células CD3. Fenotípicamente, las células T expresaron marcadores de superficie asociados con la regresión tumoral en modelos animales y estudios clínicos. Además, las células T CAR modificadas exhibieron una citotoxicidad contra los objetivos que expresaron el antígeno tanto *in vitro* como *in vivo*.

### Ejemplo 1

#### Plataforma de producción a pequeña escala

Se estableció una novedosa plataforma de producción a pequeña escala que era simple, confiable y reproducible. La plataforma de producción era menos compleja y más robusta que los métodos existentes e implementó manipulaciones mínimas con respecto a la activación, transducción y expansión de las células T CAR. Además, las células T CAR producidas por los métodos contemplados en el presente documento produjeron productos terapéuticos de células T CAR modificadas que eran comparables, o superiores, a los producidos por los métodos existentes.

#### 1. Cosecha de PBMC

Las PBMC se utilizaron como fuente de células T para la plataforma de producción de investigación a pequeña escala. Las PBMC de una extracción de sangre completa pueden aislarse manualmente mediante el uso de un gradiente de FICOLL™ y lavado. En este experimento, se utilizaron PBMC congeladas. Los frascos congelados de PBMC se descongelaron en un baño de agua a 37 °C. Una vez descongeladas, las PBMC se transfirieron a un tubo cónico de 50 ml que contenía ~ 20-30 ml de medio TCGM caliente y después se centrifugó a 175 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se retiró y el sedimento celular se resuspendió en un pequeño volumen de TCGM que contenía IL-2 a 250 UI/ml. Se contó una alícuota de las células resuspendidas mediante un multisizer o hemocitómetro y se determinó el número de células viables.

#### 2. Iniciación y activación del cultivo

En el día 0 (D0), las PBMC se sembraron en matraces de cultivo T25 a 1 x 10<sup>6</sup> células/ml en un volumen total de 10 ml de TCGM con IL-2 a 250 UI/ml. Las células T se activaron mediante la adición de 5 µl de anticuerpo anti-CD3 a 100 ng/µl y 5 µl de anticuerpo anti-CD28 a 100 ng/µl al cultivo. Una vez que los cultivos de PBMC se establecieron,

se incubaron en una incubadora a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> hasta el Día 1 (D1) para las células transducidas posteriormente o hasta el Día 3 (D3) si las células no fueron transducidas posteriormente.

### 3. Transducción

5 Se determinó el título de vectores lentivirales de T CAR. Las células se transdujeron a  $1-2 \times 10^8$  TU/10<sup>6</sup> PBMC (número de PBMC sembradas en D0). El virus se diluyó en TCGM + IL-2 hasta un volumen de 2 ml o 20 % v/v del volumen de cultivo. Las células se transdujeron con virus durante aproximadamente 48 horas, hasta el día 3 (D3).

10 Varios experimentos determinaron que la transducción era más eficiente aproximadamente de 20 a 24 horas después de la activación de las células. Las células se transdujeron con un lentivirus que expresa GFP a  $1-2 \times 10^8$  TU/10<sup>6</sup> PBMC en D0, D1 y D2. Después de la transducción, las células que expresaron GFP se aislaron mediante análisis de FACS para determinar el porcentaje de varios tipos de células T transducidas y el número de copias del vector (VCN) de las células transducidas. Las células que expresaron GFP se analizaron en base a la expresión de marcadores de células T. Se identificaron más células transducidas que expresaban GFP y los marcadores de células T CD3, CD8 o CD4 cuando las células se transdujeron de 20 a 24 horas (D1) después de la activación. Figura 1. Además, el VCN fue mayor en las células transducidas de 20 a 24 horas (D1) después de la activación. Figura 1.

20 Experimentos adicionales determinaron que la eficiencia de transducción de las células T activadas mediante el uso de ligandos de CD3 y CD28 solubles fue comparable a la eficiencia de transducción de las células T activadas por otros métodos. Las PBMC se activaron mediante el uso de (i) anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 unidos a la placa a una concentración de  $50 \text{ ng/ml}$  durante 20-24 horas; (ii) anticuerpos solubles anti-CD3 y anti-CD28 a una concentración de  $50 \text{ ng/ml}$  durante 20-24 horas; y los linfocitos enriquecidos de la misma fuente que las PBMC se activaron mediante el uso de (iii) anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 unidos a perlas, se usaron Dynabeads CD3/CD28 en una proporción de 3 perlas a 1 célula T durante 20-24 horas. Después de la activación, las células se transdujeron con un lentivirus que expresa anti-CD19 a  $1-2 \times 10^8$  TU/10<sup>6</sup> PBMC. Se identificaron más células transducidas que expresaban un CAR anti-CD 19 y los marcadores de células T CD3, CD8 o CD4 cuando las células se activaron con anticuerpos solubles anti-CD3 y anti-CD28 en comparación con otros métodos. Figura 2. Además, el VCN también fue mayor en las células activadas con anticuerpos solubles anti-CD3 y anti-CD28. Figura 2.

30 Los experimentos también determinaron que la activación y transducción en bolsas de cultivo celular fue comparable a la transducción en matraces. Las PBMC se activaron a D0 mediante el uso de anticuerpos solubles anti-CD3 y anti-CD28 a una concentración de  $50 \text{ ng/ml}$  durante 20-24 horas. Después de la activación, las células se transdujeron con un lentivirus que expresa  $\kappa_{\text{pALC}}$  a  $3 \times 10^8$  TU/10<sup>6</sup> PBMC en D1. El número de células transducidas que expresaron  $\kappa_{\text{pALC}}$  y los marcadores de células T CD3, CD8 o CD4 fue comparable cuando las células se activaron y transdujeron en bolsas de cultivo celular o en matraces. Figura 3.

### 4. Expansión

40 También se determinó la expansión de células T entre las PBMC activadas por diferentes métodos. Las PBMC se activaron mediante el uso de (i) anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 unidos a la placa a una concentración de  $50 \text{ ng/ml}$  durante 20-24 horas; (ii) anticuerpos solubles anti-CD3 y anti-CD28 a una concentración de  $50 \text{ ng/ml}$  durante 20-24 horas; y (iii) anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 unidos a perlas, se usaron Dynabeads en una proporción de 3:1 de perlas:células T durante 20-24 horas. Después de la activación, las células se transdujeron con un lentivirus que expresaba CAR anti-CD 19 a  $1-2 \times 10^8$  TU/10<sup>6</sup> PBMC. Las células activadas y transducidas se cultivaron para su expansión hasta los 10 días. La expansión celular entre las PBMC activadas por los tres métodos fue comparable en todo el período de cultivo de expansión. Figura 4.

50 Las PBMC de múltiples donantes que fueron sometidos a los métodos de producción de células T contemplados en el presente documento mostraron una reproducible y robusta expansión, expresión de CAR en la superficie celular y VCN. Las PBMC se activaron mediante el uso de anticuerpos solubles anti-CD3 y anti-CD28 a una concentración de  $50 \text{ ng/ml}$  durante 20-24 horas. Las células activadas se transdujeron con un lentivirus que expresaba CAR anti-CD19 a  $1-2 \times 10^8$  TU/10<sup>6</sup> PBMC. Las células activadas y transducidas de múltiples donantes que se cultivaron durante 10 días mostraron velocidades de crecimiento comparables entre sí y con un control no transducido (UTD). Figura 5. La Figura 5 también muestra el número de linfocitos presentes en el día 10 en cada cultivo expandido. El análisis de FACS determinó que la expresión anti-CD19 fue comparable entre los productos celulares generados a partir de diferentes pacientes, con un promedio de aproximadamente 61 % de marcaje y un intervalo de 29 % a 80 % ( $n = 5$ ). Figura 6. La qPCR también demostró que el VCN entre los productos celulares fue comparable. Figura 6.

### 5. Eliminación tumoral específica del antígeno

60 La eliminación tumoral específica del antígeno por parte de las células T activadas mediante el uso de anticuerpos solubles fue tan buena o mejor que las células T activadas mediante el uso de otros métodos. Las PBMC se activaron mediante el uso de (i) anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 unidos a la placa a una concentración de  $50 \text{ ng/ml}$  durante 20-24 horas; (ii) anticuerpos solubles anti-CD3 y anti-CD28 a una concentración de  $50 \text{ ng/ml}$  durante 20-24 horas; y (iii) anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 unidos a perlas, se usaron Dynabeads en una proporción de 3:1 de perlas:células

T durante 20-24 horas. Después de la activación, las células se transdujeron con un lentivirus que expresaba CAR anti-CD 19 a  $1-2 \times 10^8$  TU/ $10^6$  PBMC. Las células activadas y transducidas se cultivaron para su expansión hasta los 10 días. Las células T CAR anti-CD19 terapéuticas se cultivaron conjuntamente con células Daudi que expresan CD19 o células K562 que no expresan CD19. Después de 10 días de cocultivo, las células T CAR anti-CD19 activadas mediante el uso de anticuerpos solubles mataron las células Daudi, igual o mejor que las células T CAR anti-CD19 activadas con los otros métodos. Figura 7 y Figura 8.

6. La plataforma de producción a pequeña escala

En general, la plataforma de producción a pequeña escala se utilizó para desarrollar un proceso de expansión de células T de 10 días: en D0, las PBMC se siembran en placas a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml y se activan mediante el uso de 50 ng/ml de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 durante aproximadamente 24 horas; en D1, las PBMC activadas se transdujeron con  $2 \times 10^8$  TU/ $10^6$  células durante aproximadamente 24 horas a 48 horas; D3 a D9, las células transducidas se expanden y se vuelven a sembrar para mantener el crecimiento en fase logarítmica. El proceso de producción de células T generalmente produce una expansión de 100-600 veces de células T según el donante.

Los experimentos anteriores identificaron elementos importantes para transferir el proceso de investigación a pequeña escala a un proceso de producción con cGMP clínicas a gran escala. Los elementos se muestran en la Tabla 1

Tabla 1.

Elementos a pequeña escala traducidos a una plataforma de producción a gran escala	
Material de partida	PBMC
Formulación de medios	TCGM: XVIVO-15, suplementado con HABS al 5 %, Glutamax 2 mM, HEPES 10 mM y IL-2 a 250 UI/ml (y opcionalmente IL7 y/o IL-15)
Método de activación	Anticuerpos anti-CD3 soluble a 50 ng/ml y anti-CD28 soluble a 50 ng/ml
Transducción	Transducción 20-24 horas después de la activación
Expansión	Las células se mantienen en crecimiento en fase logarítmica al sembrar de nuevo a una concentración de $0,3 \times 10^6$ células/ml a $0,5 \times 10^6$ células/ml

7. Robustez de la plataforma

La robustez de la plataforma de producción se demostró mediante el diseño, la producción y la evaluación de múltiples construcciones de CAR lentivirales. Las construcciones variaron con respecto a las regiones del promotor, scFV, +/- enlazador, bisagra, transmembrana y dominios de señalización utilizados. Figura 16.

Se produjeron sobrenadantes de vectores lentivirales (LV) que codifican CAR en células HEK 293T como se describe en otra parte (por ejemplo, Naldini y otros, 1996, Dull y otros, 1998 y Zufferey y otros, 1998). Las células 293 se transfectan de manera transitoria con 4 plásmidos: un plásmido que codifica gag-pol de VIH, un plásmido que codifica la proteína de envoltura VSV-G, un plásmido que codifica la proteína rev de VIH y un vector de transferencia lentiviral que codifica un CAR, por ejemplo, la Figura 16.

Las células T CAR se produjeron como se describe en el Ejemplo 1, más arriba. Los diversos productos de células T CAR mostraron velocidades de crecimiento comparables según lo determinado por las duplicaciones de la población (Figura 17A); la qPCR mostró que el VCN fue comparable entre las diferentes células T CAR, con aproximadamente 1 a 4 copias por célula (Figura 17B); y FACS mostró una expresión en la superficie celular comparable de las diferentes construcciones de CAR; el por ciento de marcaje varió de aproximadamente 40 % a 60 % según la construcción (Figura 17C).

8. Generación de un producto farmacológico CART funcional

Las células T CAR que expresan anti-BCMA se produjeron como se describe en el Ejemplo 1, más arriba. Estas células T CAR mostraron una eliminación tumoral específica del antígeno. Las células T CAR que expresan anti-BCMA se cultivaron conjuntamente durante 4 horas con células K562, o las células K562 se modificaron para expresar BCMA. Las células tumorales que expresan el antígeno se marcaron con éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE) y se midió la fluorescencia mediante FACS. Las células T CAR que expresan anti-BCMA mataron a las células K562 que expresan BCMA (Figura 18A) y liberaron IFN- $\gamma$  (Figura 18B). (n = 3).

Ejemplo 2

Traducción de la plataforma de investigación de pequeña escala a una plataforma de producción de medicamentos con cGMP clínicas a gran escala

El proceso de investigación a pequeña escala permitió una evaluación de mayor rendimiento de las construcciones de CAR con la seguridad de que los datos serían comparables para la plataforma de producción de medicamentos

con cGMP a gran escala. Este ejemplo proporciona datos de experimentos representativos realizados mediante el uso de la plataforma de producción de medicamentos con cGMP clínicas a gran escala.

#### 1. Comparación entre los métodos de producción a pequeña y gran escala

La Figura 9 muestra una comparación de diagrama de flujo de la plataforma de producción de células T de investigación a pequeña escala y la plataforma de producción de medicamentos con cGMP clínicas a gran escala. Las células T CAR se produjeron mediante el uso de los procedimientos descritos en el Ejemplo 1. Para la producción a gran escala, por ejemplo, Figuras 10-12, las células T CAR se produjeron de la siguiente manera:

**Cosecha.** Las células se cosecharon por leucocitaféresis mediante el uso de un sistema de aféresis Spectra Optia® o equivalente. Los volúmenes iniciales de productos de leucocitaféresis utilizados en el proceso de producción fueron de aproximadamente 100 ml a aproximadamente 200 ml. Se contaron alícuotas de las células, se determinó la viabilidad, se criopreservaron y se caracterizaron en cuanto a las PBMC mediante el uso de un análisis de FACS.

**Aislamiento.** Las PBMC se aislaron mediante el uso de un gradiente de FICOLL™ de sistema cerrado en el Sistema de Recuperación de Sangre Autóloga Cell Saver® 5+ (Haemonetics). Después de FICOLL™, la capa leucocitaria se lavó con tampón ClinIMACS con HABS al 2 % y después se resuspendió en TCGM con IL-2 a 250 UI/ml. Se realizaron conteos de células antes y después del lavado, viabilidad y análisis de FACS de PBMC.

**Criopreservación.** Modalidades particulares del método de producción a gran escala comprenden la criopreservación de las PBMC después del aislamiento y antes de cualquier proceso de producción posterior. Las PBMC se criopreservan en TCFM y se congelan en un congelador de velocidad controlada a una temperatura de aproximadamente -80 °C a aproximadamente -135 °C a una velocidad de 1° por minuto en un congelador de velocidad controlada y se almacenan en la fase de vapor de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido.

**DÍA 0: Inicio/Activación del cultivo - Bolsas, células frescas.** Se sembraron  $1 \times 10^8$  PBMC a una densidad de  $1 \times 10^6$  PBMC/ml en TCGM con IL-2 a 250 UI/ml en bolsas de diferenciación celular GMP MACS® de 100 ml. Las PBMC se activaron mediante la adición de anticuerpo anti-CD3 a 50 ng/ml y anticuerpo anti-CD28 a 50 ng/ml al cultivo y se cultivaron durante aproximadamente 24 horas.

**DÍA 0: Inicio/Activación del cultivo - Bolsas, Células congeladas.** Modalidades particulares del proceso de producción a gran escala comprenden el uso de PBMC congeladas. Las PBMC congeladas se descongelan en un baño de agua a 37 °C y se lavan en TCGM con IL-2 a 250 UI/ml. Se sembraron  $1 \times 10^8$  PBMC descongeladas en TCGM con IL-2 a 250 UI/ml en bolsas de diferenciación celular GMP MACS® de 100 ml. Las PBMC descongeladas se activaron mediante la adición de anticuerpo anti-CD3 a 50 ng/ml y anticuerpo anti-CD28 a 50 ng/ml al cultivo y se cultivaron durante aproximadamente 24 horas.

**DÍA 0: Iniciación/Activación del cultivo - Biorreactor GREX.** Modalidades particulares del proceso de producción a gran escala comprenden la producción de células T en un biorreactor GREX. Se sembraron  $1 \times 10^8$  PBMC en TCGM con IL-2 a 250 UI/ml en 100 ml de TCGM en un GREX-100. Las PBMC se activaron mediante la adición de anticuerpo anti-CD3 a 50 ng/ml y anticuerpo anti-CD28 a 50 ng/ml al cultivo y se cultivaron durante aproximadamente 24 horas.

**Día 1: Transducción.** Las células activadas se transdujeron con  $1-2 \times 10^9$  TU de lentivirus/ $10^8$  PBMC. El lentivirus se diluyó en TCGM al 20 % del volumen de cultivo. Por ejemplo, si el volumen de cultivo fue de 100 ml de TCGM, el virus se diluyó en TCGM para producir un volumen máximo de 20 ml añadido al cultivo. Las células fueron transducidas durante aproximadamente 48 horas.

**Día 3 al Día 10: Expansión.** Las células transducidas se expanden en TCGM que contiene IL-2 a 250 UI/ml durante 5 a 8 días. En cada uno de los uno o más días de expansión, se tomaron alícuotas de las células opcionalmente y se contaron las células, se determinó la viabilidad, se criopreservaron y se caracterizaron en cuanto a las PBMC mediante el uso de un análisis de FACS. Los cultivos se volvieron a sembrar según fuera necesario a una densidad de  $0,3 \times 10^6$  PBMC/ml a  $0,5 \times 10^6$  PBMC/ml para mantener el crecimiento de las células en la fase logarítmica. Para la producción basada en bolsas de cultivo celular, en el día 7 las células se transfirieron opcionalmente a un biorreactor WAVE hasta el día 10 para permitir una mayor expansión. En una modalidad, los conteos de células se realizaron los días 3, 4, 5, 6, 7, 8 y/o 9 y/o 10. En una modalidad, si las células no alcanzan los niveles objetivo de expansión para el día 7, entonces pueden transferirse al biorreactor WAVE con perfusión de medio a 2 l/día durante los días 8 y 9 para permitir una mayor expansión.

Para la producción basada en GREX, las células se cultivaron continuamente en el biorreactor GREX durante todo el período de expansión.

**Día 10: Recuperación y criopreservación.** Las células expandidas se recuperaron y se lavaron en un sistema de recuperación de sangre autóloga Cell Saver® 5+. Las células se lavaron con 2 litros de NaCl al 0,9 % y después se realizó un lavado final con PlasmaLyte. Se realizaron conteos de células antes y después de la recuperación,

se determinó la viabilidad y se llevó a cabo un análisis de FACS para determinar la pureza e identidad de las células T CAR. Las células recuperadas se criopreservaron opcionalmente en 50 % de plasmalyte y 50 % de Cryostor 10; 50/40/10 (XVIVO/HABS/DMSO); o Cryostor 10 y se congelaron en un congelador de velocidad controlada a una temperatura de aproximadamente -80 °C a aproximadamente -135 °C a una velocidad de 1° por minuto en un congelador de velocidad controlada y se almacenaron en la fase de vapor de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido.

2. Los fenotipos celulares son comparables en los productos celulares finales entre los métodos de producción a pequeña y gran escala

Las células T CAR se produjeron mediante el uso de los métodos a pequeña escala descritos en el Ejemplo 1 y los métodos a gran escala descritos en el Ejemplo 2, más arriba. Los productos celulares finales se sometieron a análisis de FACS para estudiar la expresión de los marcadores de la superficie celular CD4, CD8, construcción de T CAR, CD56 y CD62L para determinar cualquier diferencia en la composición celular del producto final. No se observaron diferencias significativas en el fenotipo de los productos T CAR finales entre las plataformas de investigación y escala clínica.  $p \geq 0,20$  para todos los marcadores de superficie entre las dos plataformas. (n = 3). Figura 13.

3. Procesamiento celular simplificado para el aislamiento de PBMC y cosecha de células T

Una de las principales ventajas de los métodos de producción contemplados en este documento es la implementación de etapas de procesamiento en sistemas cerrados. Las PBMC se cosecharon por leucocitaféresis y se aislaron y lavaron mediante el uso de un sistema de recuperación de sangre autóloga Cell Saver® 5+ (Haemonetics). El Cell Saver® 5+ también se usó para la recuperación y el lavado de los productos finales de las células T CAR producidas.

Los productos finales de PBMC y T CAR se caracterizaron en múltiples experimentos (n = 18) para demostrar la pureza notablemente consistente de la composición celular del material de partida y los productos finales. Figura 14. La utilización del enfoque de sistema cerrado simplificó la producción y minimizó el equipamiento necesario para el procesamiento con cGMP.

4. Flexibilidad del proceso de producción

Con el fin de abordar la variabilidad de paciente a paciente, y asegurar que se puedan alcanzar los niveles de dosis requeridos de los productos de células T CAR, se compararon múltiples dispositivos para la expansión de las células T CAR para mostrar la flexibilidad ofrecida por el proceso de producción contemplado. Los procesos de producción a pequeña escala (matraz T25) y a gran escala (GREX100, bolsas de cultivo celular estático y biorreactor WAVE) se realizaron como se describió anteriormente. Las células producidas por los diferentes métodos de producción mostraron velocidades de crecimiento comparables y un mayor número de células durante un período de cultivo de 10 días. Figura 15A. El análisis de FACS mostró que la cantidad de células CD3<sup>+</sup>/CAR<sup>+</sup> fue consistente entre los métodos de producción. Figura 15B. Además, el VCN de las células CD3<sup>+</sup>/CAR<sup>+</sup> fue comparable entre los diversos métodos de producción probados. Figura 15B. Estos resultados demuestran que los métodos de producción de células T contemplados fueron flexibles y produjeron productos celulares finales comparables.

Listado de secuencias

<110> bluebird bio, Inc.

<120> MÉTODOS MEJORADOS PARA PRODUCIR

<130> BLBD-028/01WO

<150> US 61/984,558

<151> 2014-04-25

<160> 13

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Enlazador peptídico flexible

<400> 1

ES 2 800 906 T3

Asp Gly Gly Gly Ser  
1 5

5 <210> 2  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Enlazador peptídico flexible  
  
<400> 2

Thr Gly Glu Lys Pro  
1 5

15 <210> 3  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Enlazador peptídico flexible  
  
<400> 3

Gly Gly Arg Arg  
1

25 <210> 4  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Enlazador peptídico flexible  
  
<400> 4

Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5

35 <210> 5  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Enlazador peptídico flexible  
  
<400> 5

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Val Asp  
1 5 10

45 <210> 6  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Enlazador peptídico flexible  
  
<400> 6

55 Lys Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Gln Leu Ala Gln Phe Arg Ser  
1 5 10 15

Leu Asp

ES 2 800 906 T3

5  
 <210> 7  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10  
 <220>  
 <223> Enlazador peptídico flexible

15  
 <400> 7  
 Gly Gly Arg Arg Gly Gly Gly Ser  
 1 5

20  
 <210> 8  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25  
 <220>  
 <223> Enlazador peptídico flexible

30  
 <400> 8  
 Leu Arg Gln Arg Asp Gly Glu Arg Pro  
 1 5

35  
 <210> 9  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40  
 <220>  
 <223> Enlazador peptídico flexible

45  
 <400> 9  
 Leu Arg Gln Lys Asp Gly Gly Gly Ser Glu Arg Pro  
 1 5 10

50  
 <210> 10  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

55  
 <220>  
 <223> Enlazador peptídico flexible

60  
 <400> 10  
 Leu Arg Gln Lys Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Arg Pro  
 1 5 10 15

65  
 <210> 11  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

65  
 <220>  
 <223> Secuencias de escisión de polipéptidos



**REIVINDICACIONES**

1. Un método in vitro para producir un producto terapéutico de células T que comprende:
  - a) proporcionar una población de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) que comprende células T y células presentadoras de antígeno (APC);
  - b) cultivar la población de PBMC durante 16 horas a 32 horas antes de la transducción en un medio de cultivo celular que comprende i) interleucina-2 (IL-2), ii) un anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a CD3 de este, y iii) un anticuerpo anti-CD28 o un fragmento de unión a CD28 de este, B7-1 o un fragmento de unión a CD28 de este, o B7-2 o un fragmento de unión a CD28 de este, en donde el cultivo activa y estimula las células T;
  - c) transducir la población de PBMC activadas en la etapa b) con un vector lentiviral que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR); y
  - d) cultivar la población de PBMC en un medio de cultivo celular para expandir las células T transducidas; para producir así el producto terapéutico de células T.
  
2. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde;
  - a) cosechar u obtener las PBMC comprende leucocitaféresis; y/o
  - b) aislar las PBMC comprende sedimentación; y/o
  - c) aislar las PBMC comprende la sedimentación realizada mediante el uso de una centrífuga de flujo semiautomatizada.
  
3. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde el medio de cultivo celular comprende IL-2 a 250 UI/ml.
  
4. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde el medio de cultivo celular;
  - a) es medio de cultivo de células T (TCGM); o
  - b) es medio de cultivo de células T (TCGM) que comprende además una o más citocinas adicionales; o
  - c) es TCGM que comprende además una o más citocinas adicionales seleccionadas de cualquiera de: IL7, IL-15, IL-9 e IL-21.
  
5. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el método comprende además;
  - a) lavar las PBMC en un tampón o medio de cultivo celular; y/o
  - b) lavar las PBMC en un medio de cultivo de células T (TCGM) que contiene una o más citocinas; y/o
  - c) lavar las PBMC en un medio de cultivo de células T (TCGM) que contiene una o más citocinas seleccionadas de cualquiera de: IL-2, IL7, IL-15, IL-9 e IL-21; o
  - d) lavar las PBMC en un medio de cultivo de células T (TCGM) que contiene IL-2; y/o
  - e) lavar las PBMC en un medio de cultivo de células T (TCGM) que contiene IL-2 a 250 UI/ml.
  
6. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde;
  - a) las PBMC se cultivan con un anticuerpo anti-CD3 soluble y un anticuerpo anti-CD28 soluble; y/o
  - b) las PBMC se cultivan con un anticuerpo anti-CD3 soluble a una concentración de 50 ng/ml y un anticuerpo anti-CD28 soluble; y/o
  - c) las PBMC se cultivan con un anticuerpo anti-CD3 soluble y un anticuerpo anti-CD28 soluble a una concentración de 50 ng/ml.
  
7. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde;
  - a) las PBMC de la etapa b) se cultivan durante al menos 18 horas antes de la transducción; y/o
  - b) las PBMC de la etapa b) se cultivan durante al menos 24 horas antes de la transducción.
  
8. El método de conformidad con la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en donde se usan  $1 \times 10^9$  TU a  $2 \times 10^9$  TU del vector lentiviral para transducir las  $1 \times 10^8$  células sembradas.
  
9. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde;
  - a) el vector lentiviral se diluye al 20 % v/v del volumen total de cultivo; y/o
  - b) el vector lentiviral se diluye al 40 % a 50 % v/v del volumen de cultivo total; y/o
  - c) las PBMC se transducen durante 18 a 48 horas; y/o
  - d) las PBMC se transducen durante 18 a 36 horas; y/o
  - e) las PBMC se transducen durante 24 horas.

10. El método de conformidad con 1, en donde el CAR comprende
- 5 a) un dominio extracelular que se une a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en: receptor alfa de folato, 5T4, integrina  $\alpha_v\beta_6$ , BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, familia de EGFR que incluye ErbB2 (HER2), EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetal, FR $\alpha$ , GD2, GD3, 'Glypican-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$ 2, Lambda, Lewis-Y, Kappa, Mesotelina, Mucl,
- 10 Muc16, NCAM, Ligandos de NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, Survivina, TAG72, TEM y VEGFR2;
- b) un dominio transmembrana derivado de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: CD8 $\alpha$ ; CD4, CD28, CD45, PD1 y CD152;
- 15 c) uno o más dominios de señalización coestimuladora intracelular seleccionados del grupo que consiste en: CD28, CD54 (ICAM), CD134 (OX40), CD137 (41BB), CD152 (CTLA4), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1) y CD278 (ICOS); y
- d) un dominio de señalización de CD3 $\zeta$ .
11. El método de conformidad con la reivindicación 10, en donde;
- 20 a) el dominio extracelular comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une al antígeno; y/o
- b) el dominio transmembrana se deriva de CD8 $\alpha$  o CD28; y/o
- 25 c) el uno o más dominios de señalización coestimuladora es cualquiera de: CD28, CD134 y CD137; y/o
- d) el CAR comprende además un polipéptido de la región bisagra; y/o
- e) el CAR comprende además un polipéptido de la región bisagra de IgG1 o CD8 $\alpha$ ; y/o
- f) el CAR comprende además un péptido señal; y/o
- 30 g) el CAR comprende además un polipéptido señal de cadena pesada IgG1, o un polipéptido señal de CD8 $\alpha$ , o un polipéptido señal del receptor alfa de GM-CSF humano.
12. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde;
- 35 a) las PBMC en la etapa d) se cultivan para su expansión durante 5 a 8 días; y/o
- b) las PBMC en la etapa d) se cultivan para su expansión durante 5 días a 8 días en una bolsa de cultivo celular; y/o
- c) las PBMC en la etapa d) se cultivan para su expansión durante 5 días en una bolsa de cultivo celular y después se cultivan durante 3 días en un biorreactor; y/o
- d) las PBMC en la etapa d) se cultivan para su expansión durante 5 días a 8 días en un biorreactor.
- 40 13. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde;
- 45 a) el número de células T se expande al menos 50 veces durante el cultivo de la etapa d), o
- b) el número de células T se expande al menos 100 veces durante el cultivo de la etapa d); o
- c) el número de células T se expande al menos 300 veces durante el cultivo de la etapa d); o
- d) el número de células T se expande al menos 400 veces durante el cultivo de la etapa d); o
- e) el número de células T se expande al menos 500 veces durante el cultivo de la etapa d); o
- f) el número de células T se expande al menos 600 veces durante el cultivo de la etapa d).

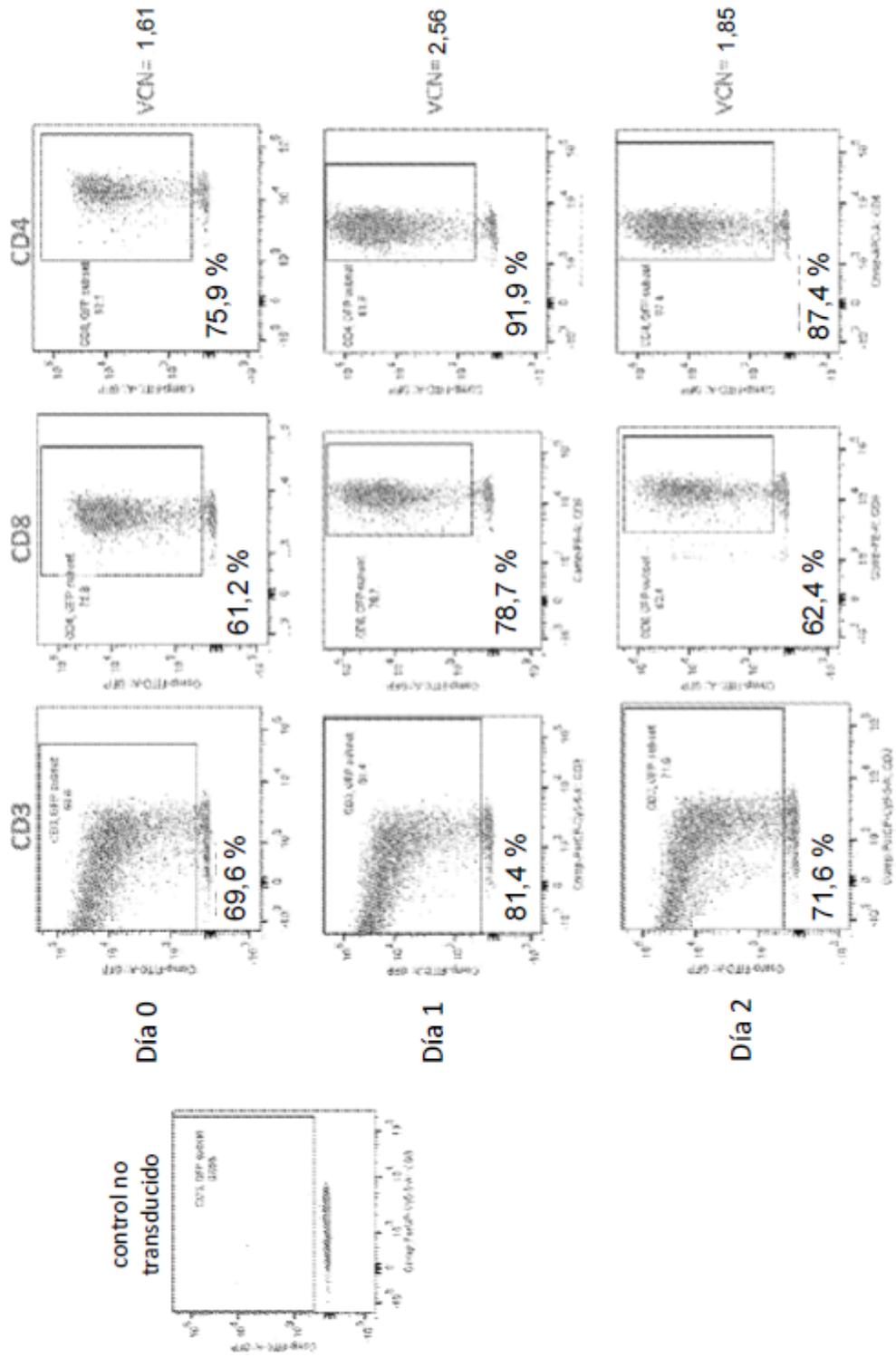
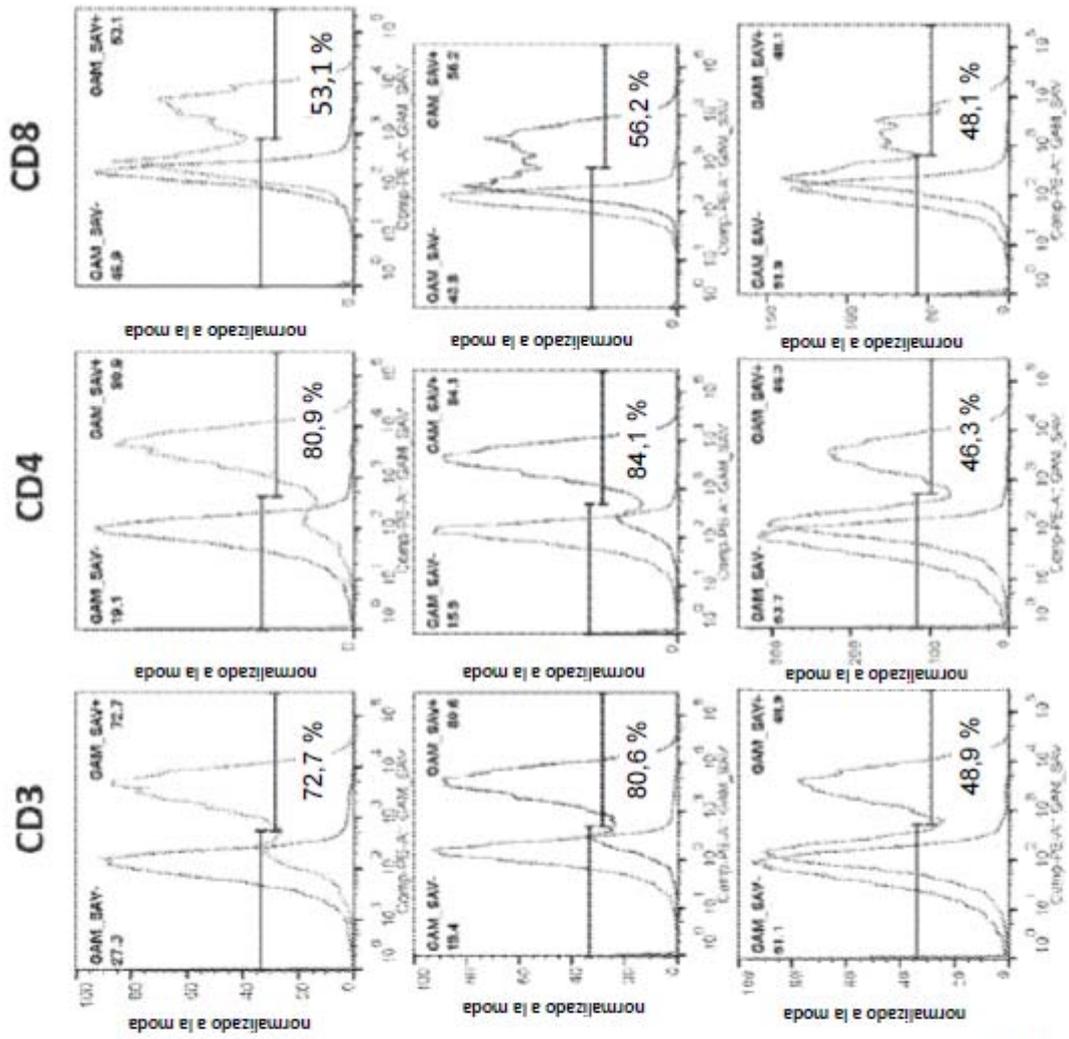


Figura 1



CD3/28 unido a placa  
VCN=1,60

CD3/28 soluble  
VCN=1,95

perlas CD3/28  
VCN=1,32

Figura 2

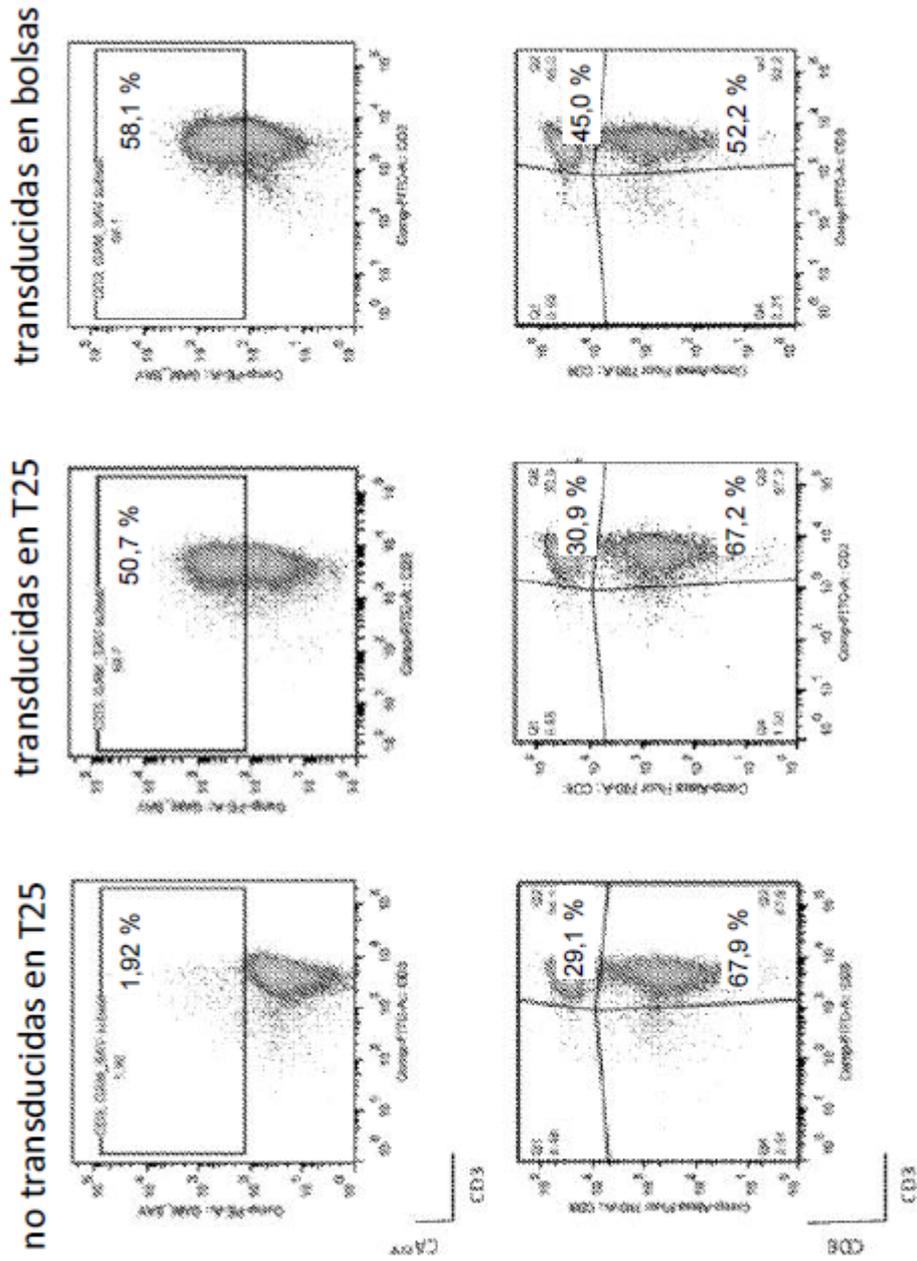


Figura 3

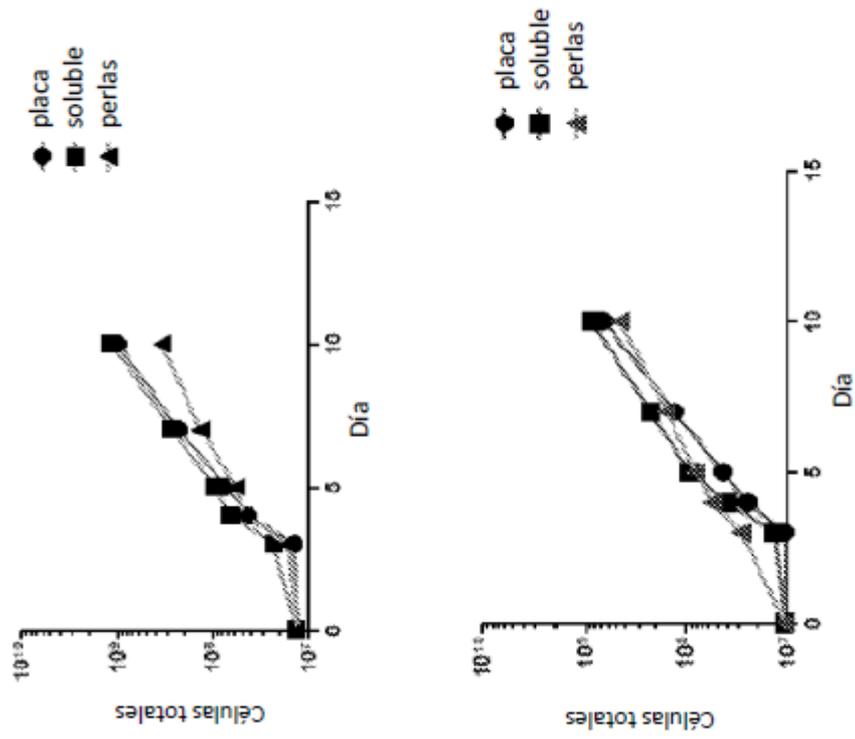
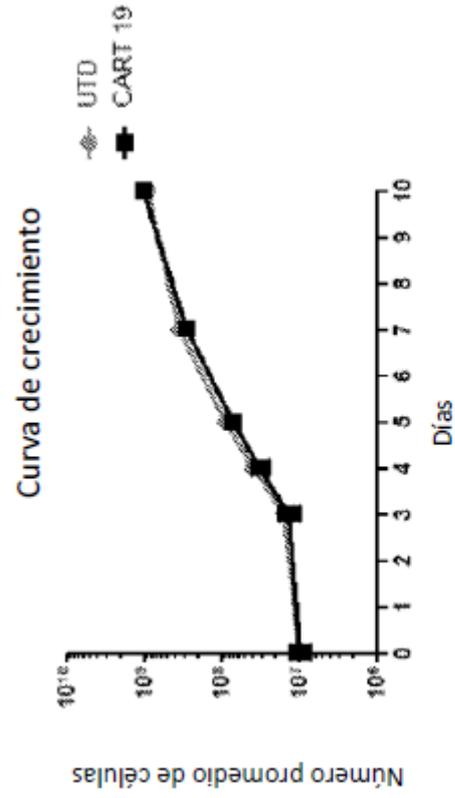
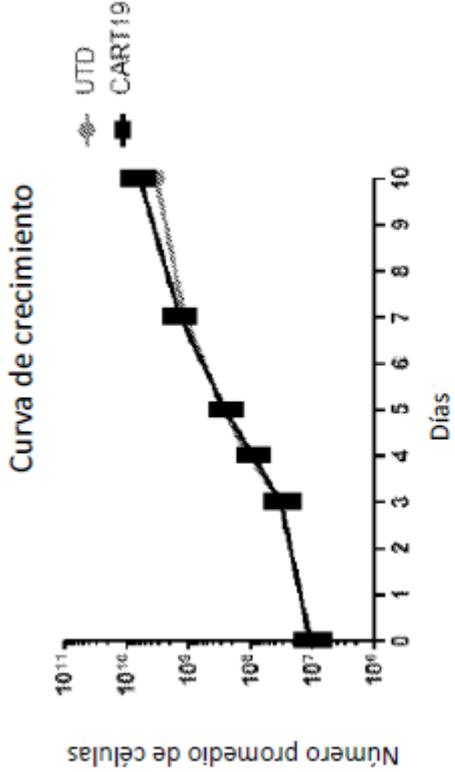


Figura 4



KP36943- linfocitos al 69 % en PBMC  
 KP37050 linfocitos al 61 % en PBMC  
 KP36649- linfocitos al 22,3 % en PBMC



KP36253- linfocitos al 43,8 % en PBMC  
 KP36307- linfocitos al 51 % en PBMC  
 KP36649- linfocitos al 22,3 % en PBMC

Figura 5

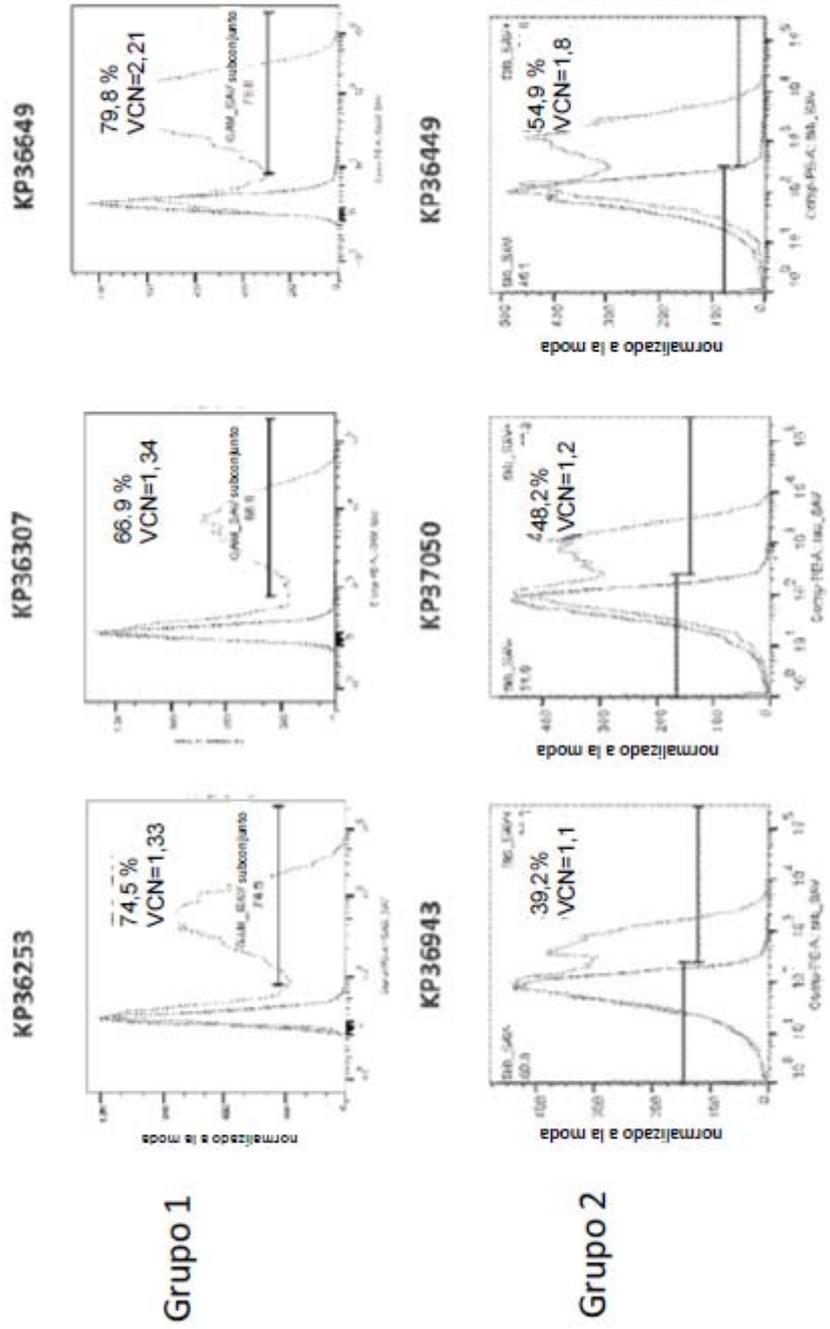


Figura 6

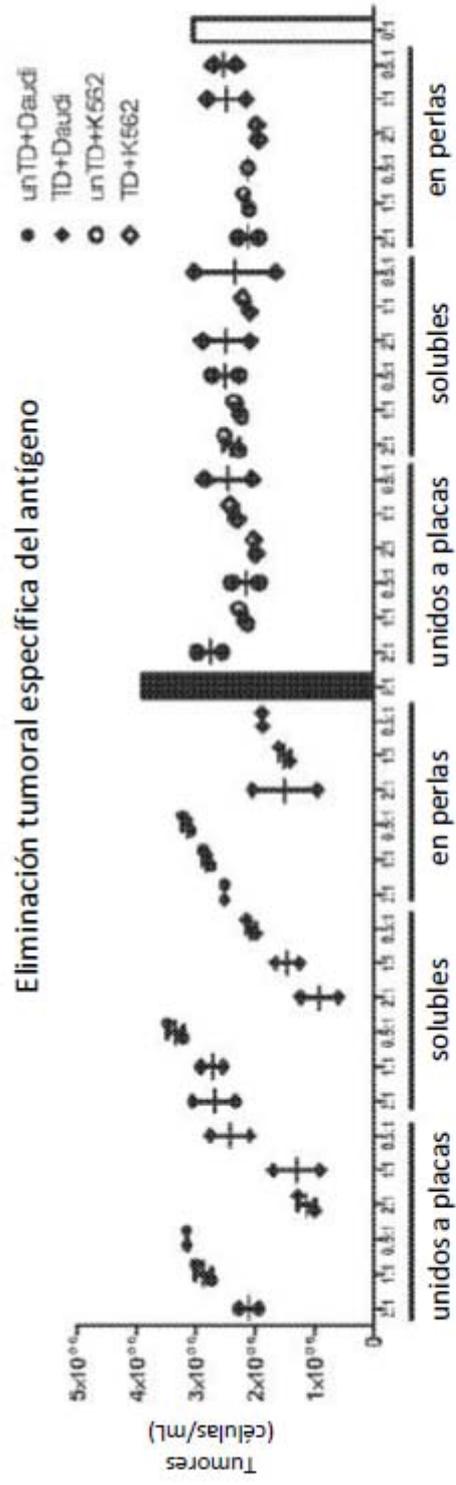


Figura 7

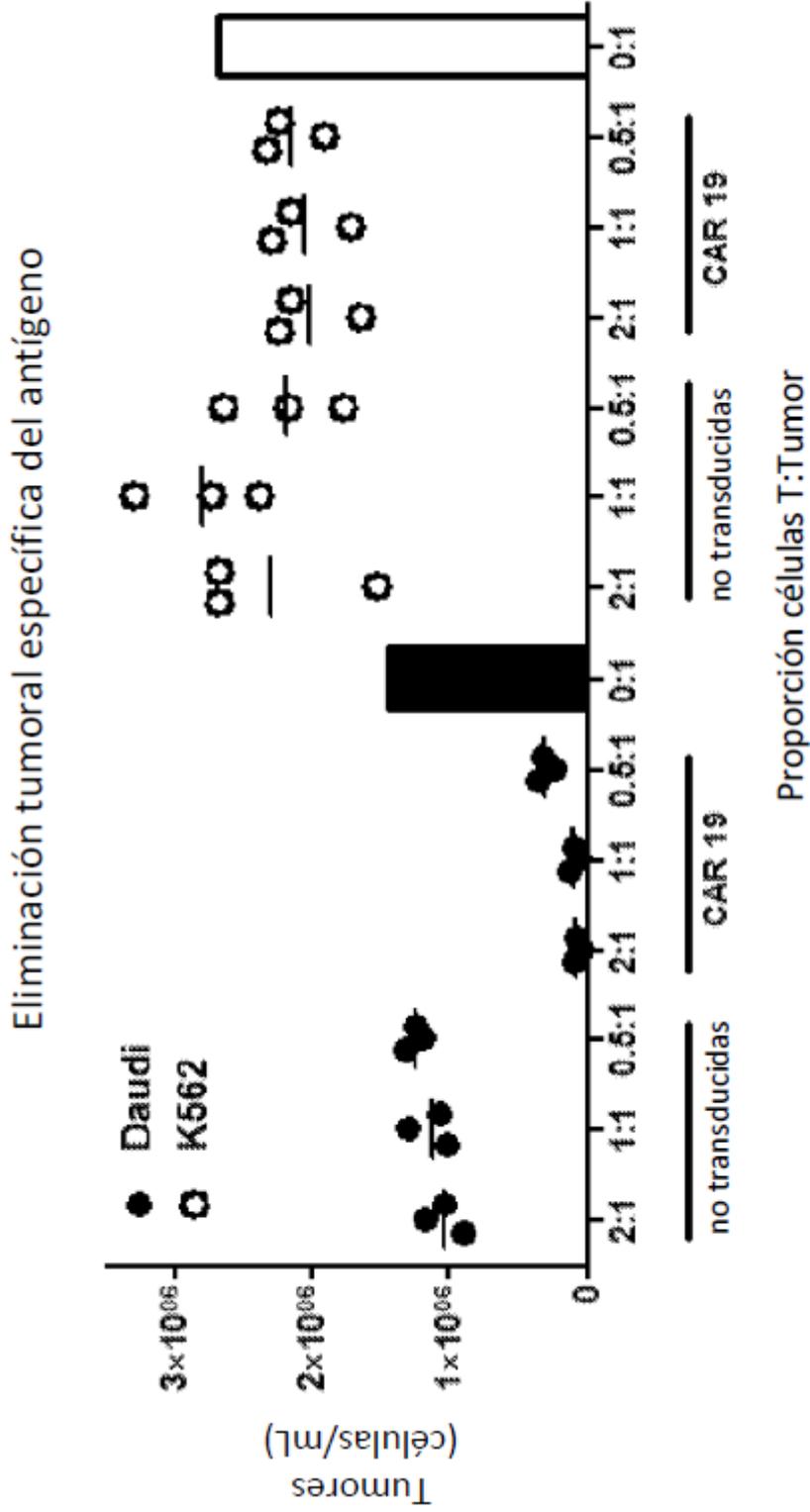


Figura 8

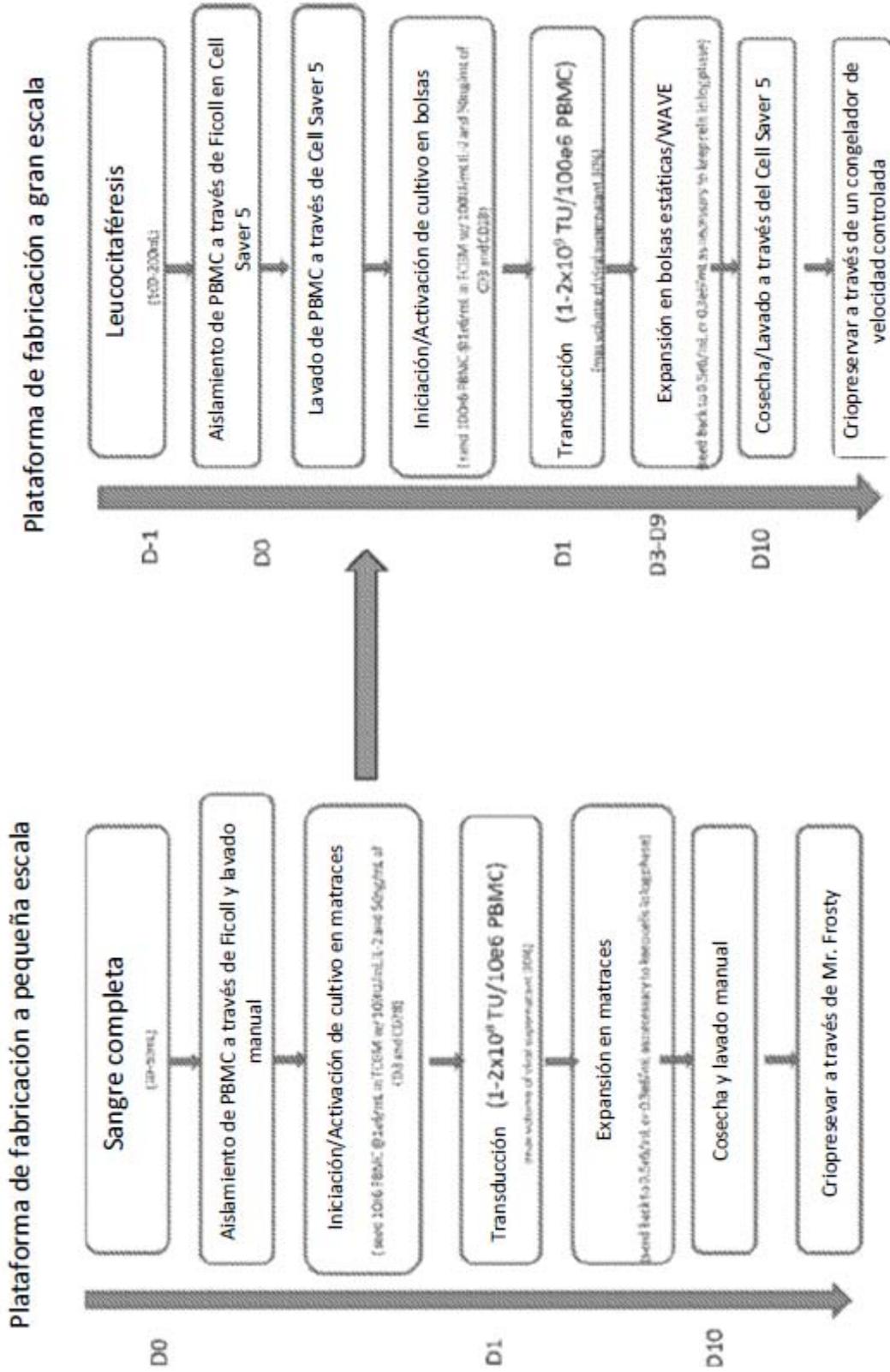


Figura 9

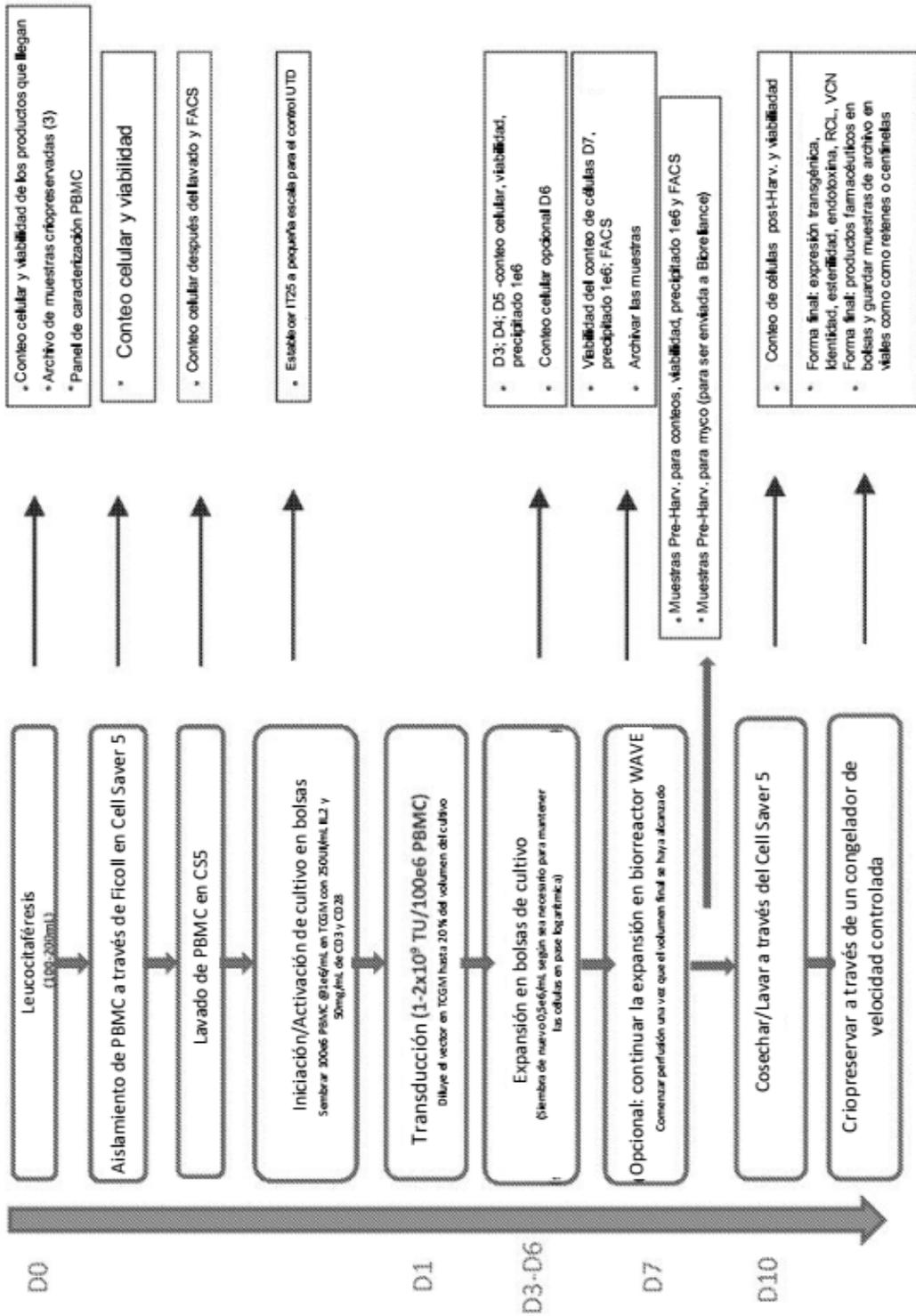


Figura 10

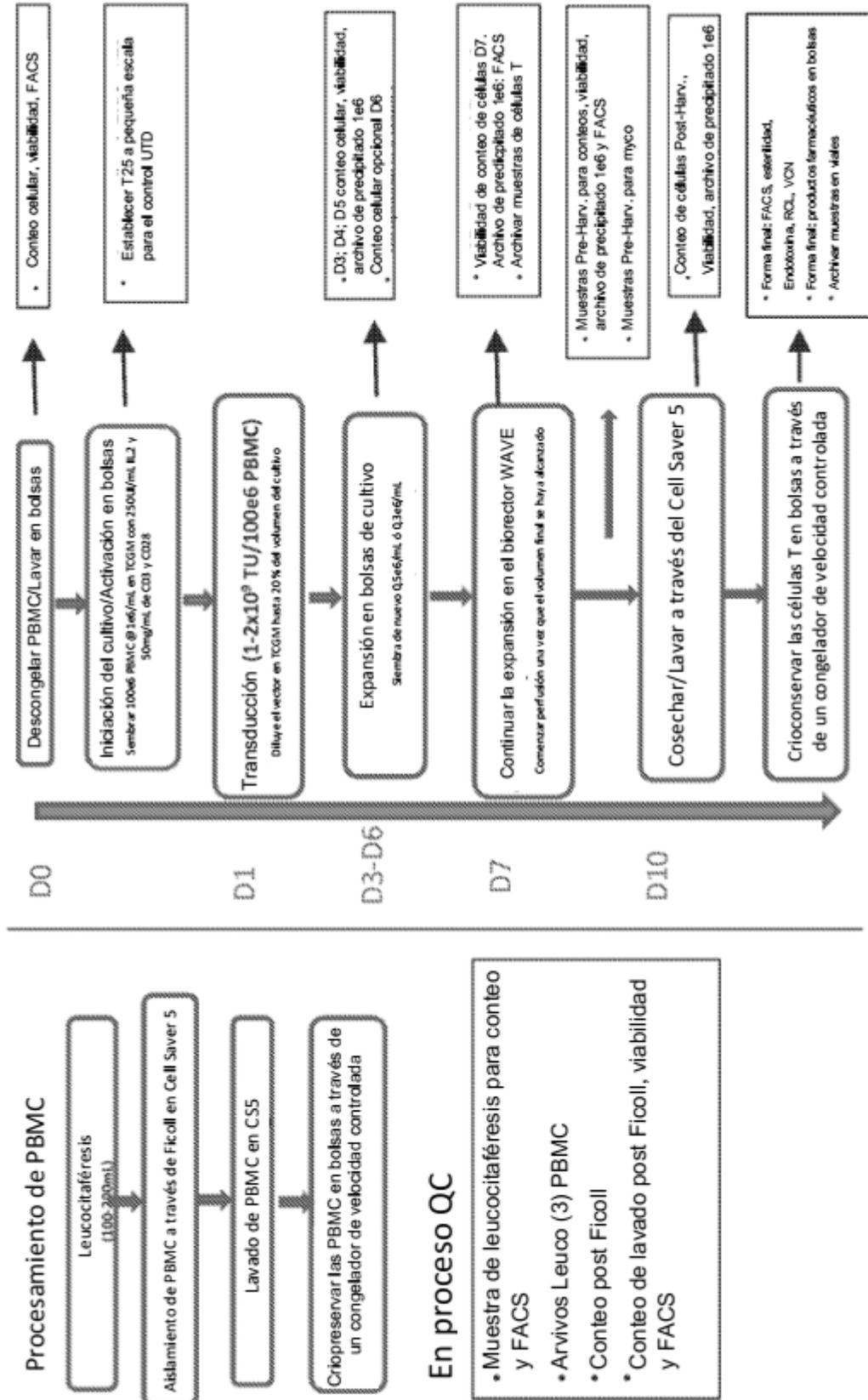


Figura 11

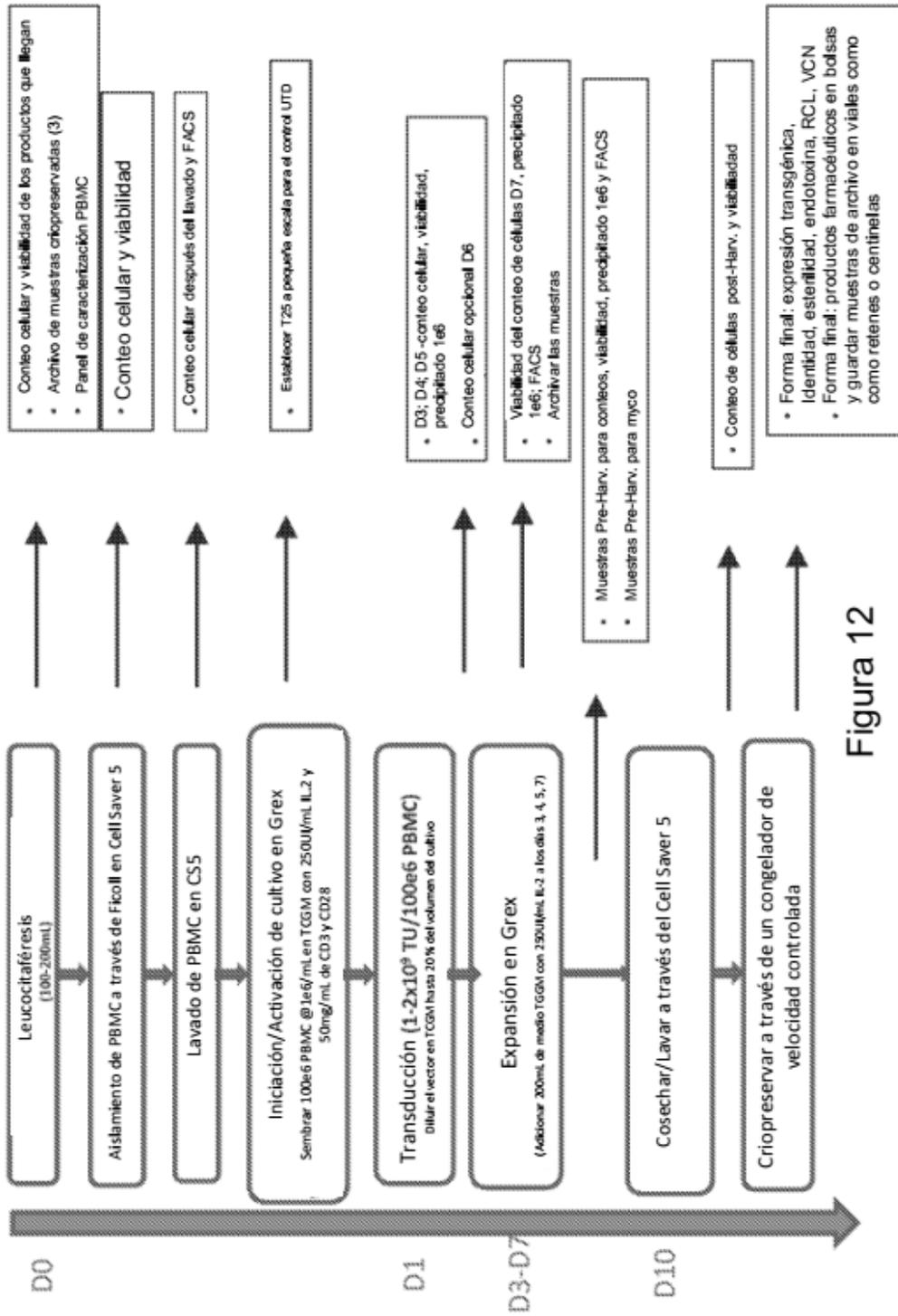


Figura 12

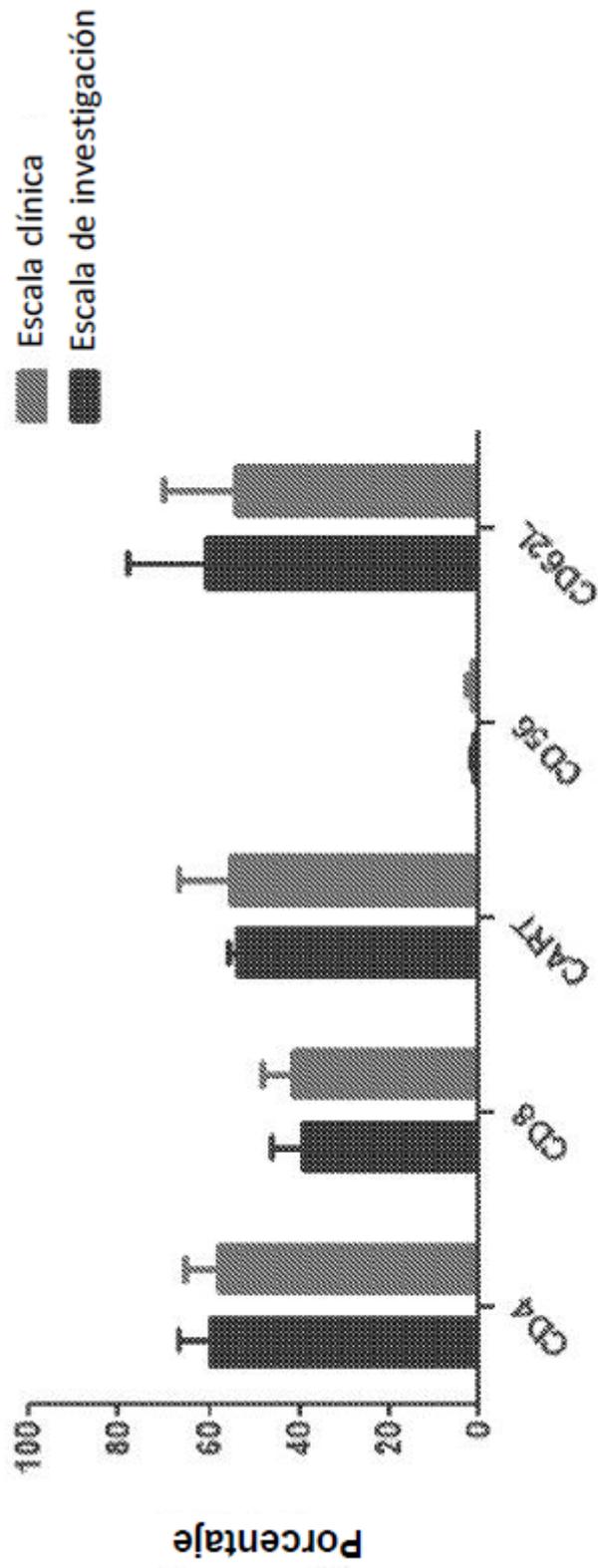


Figura 13

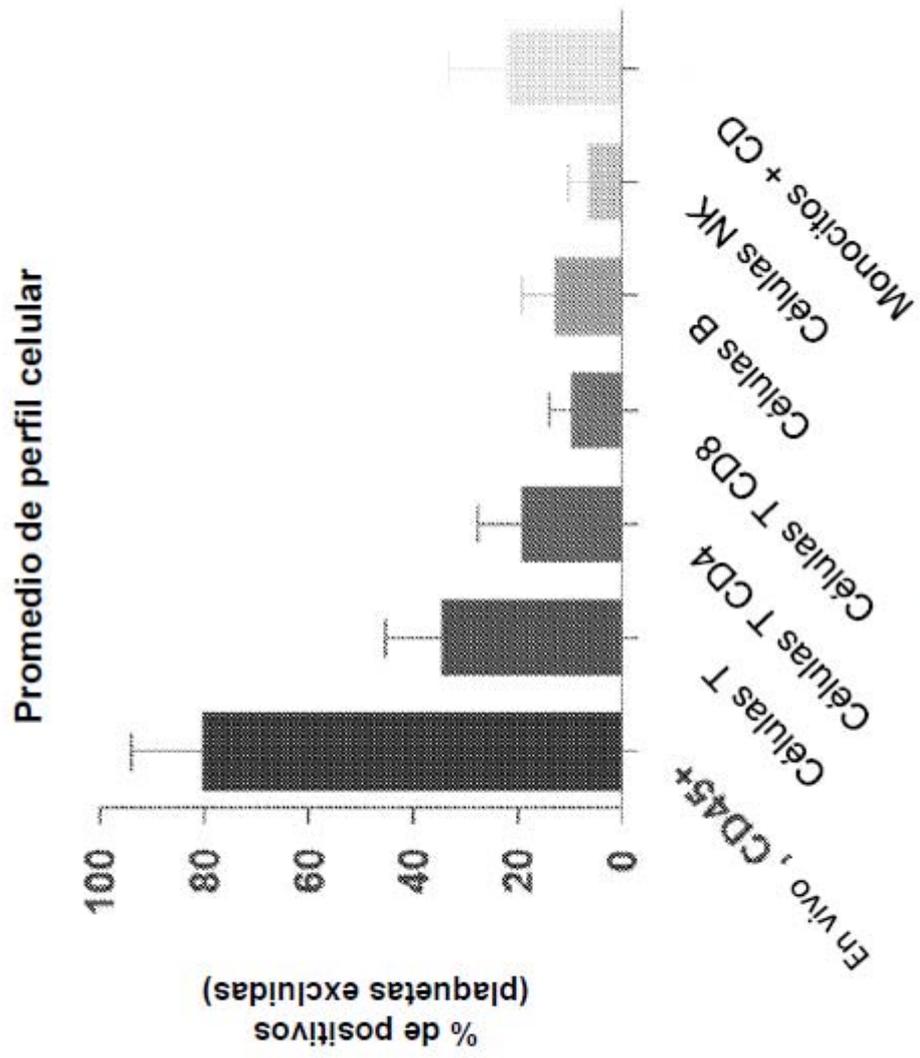


Figura 14

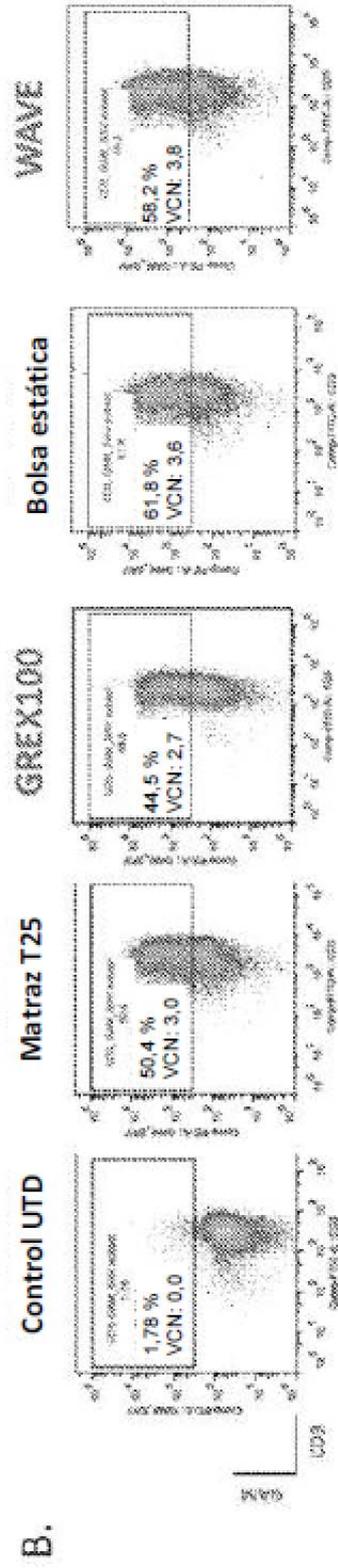
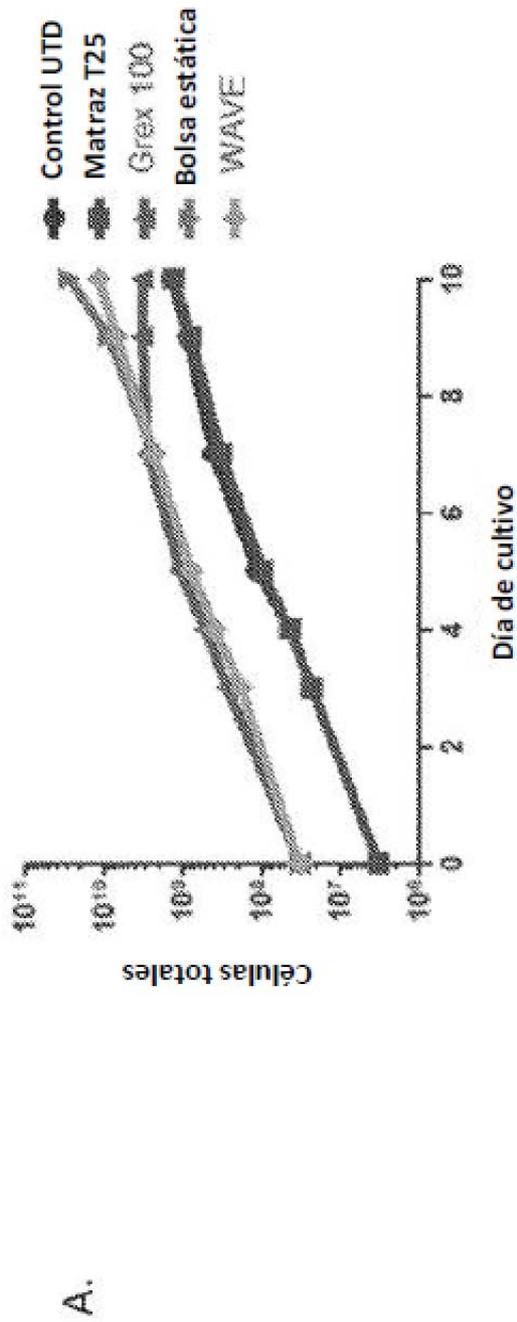


Figura 15

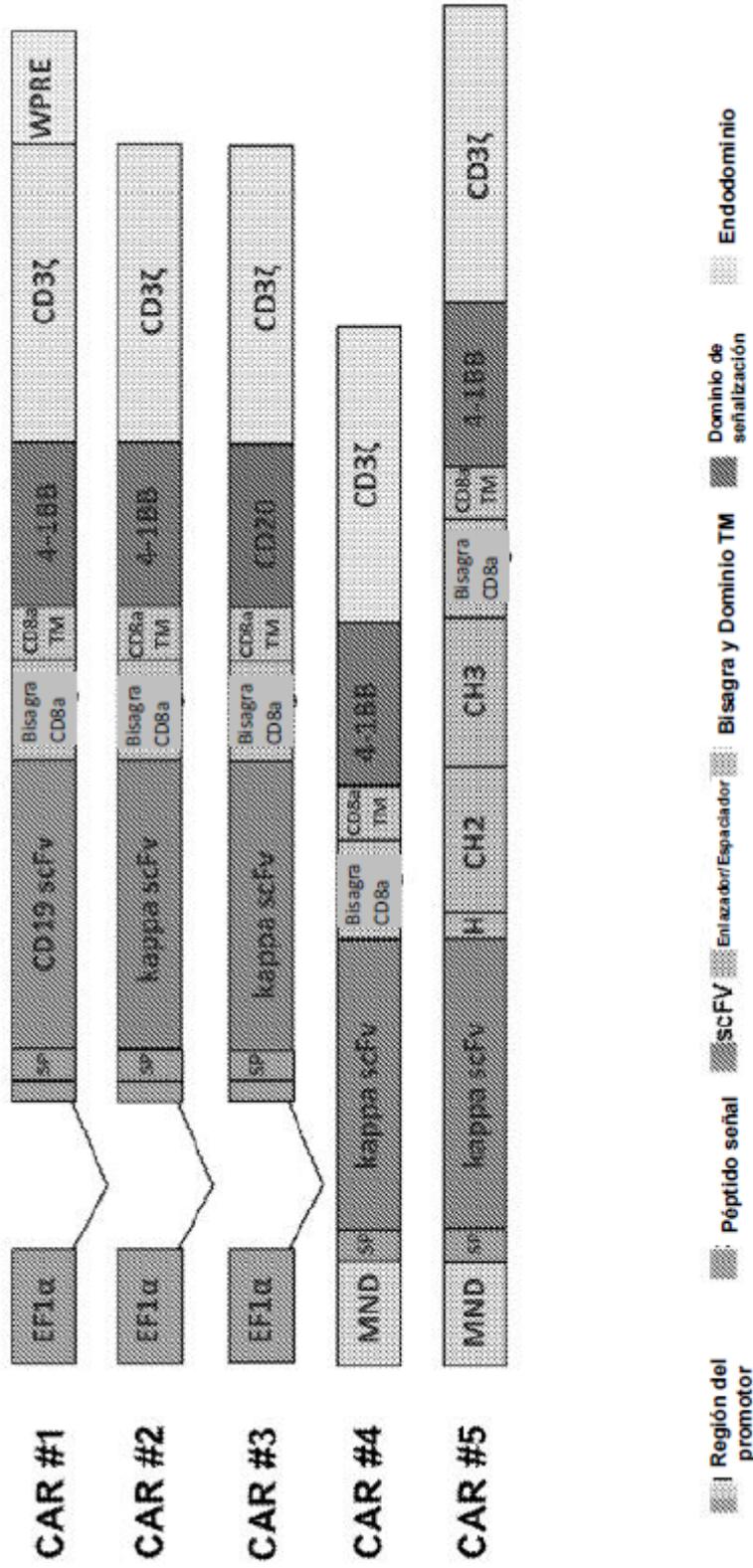


Figura 16

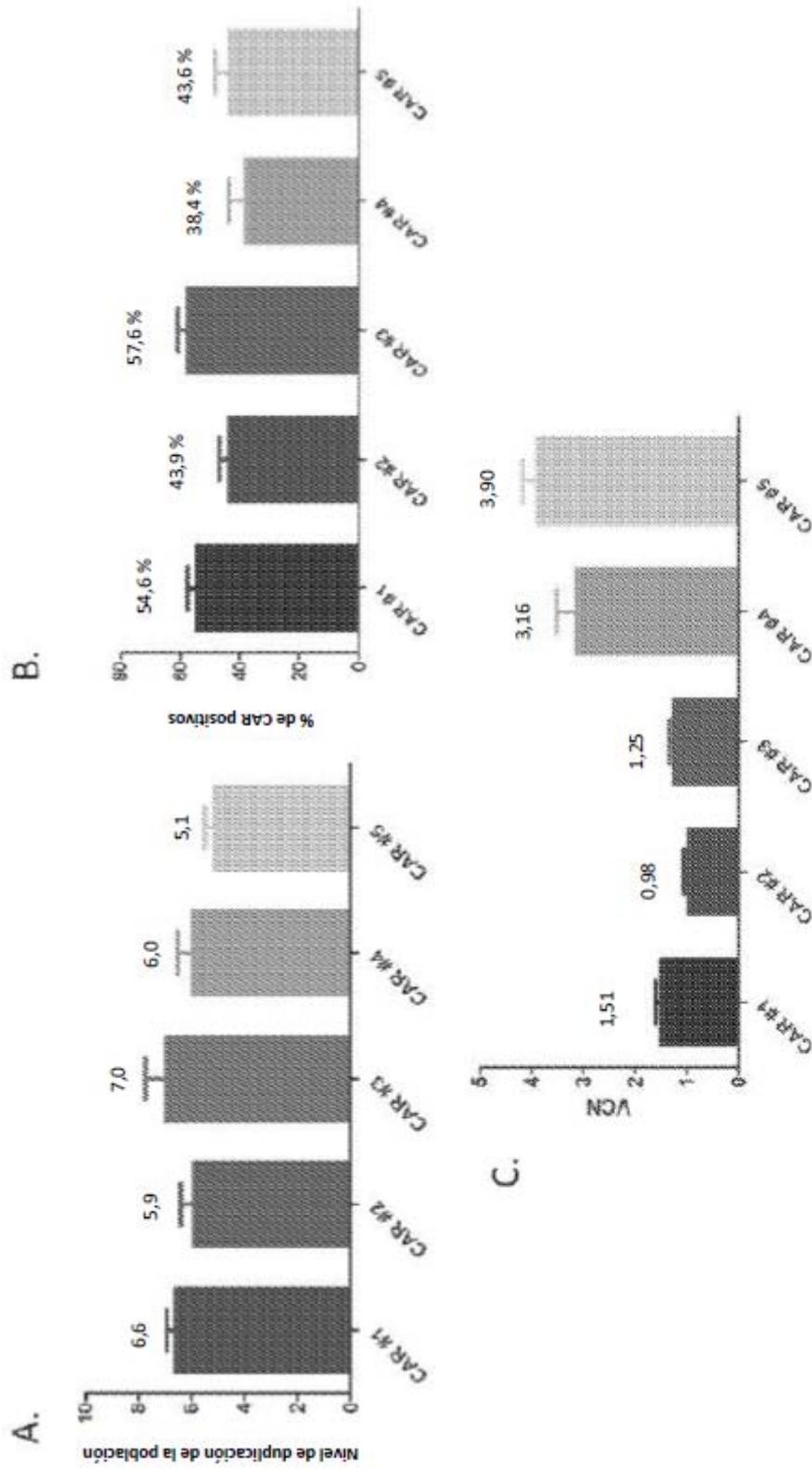


Figura 17

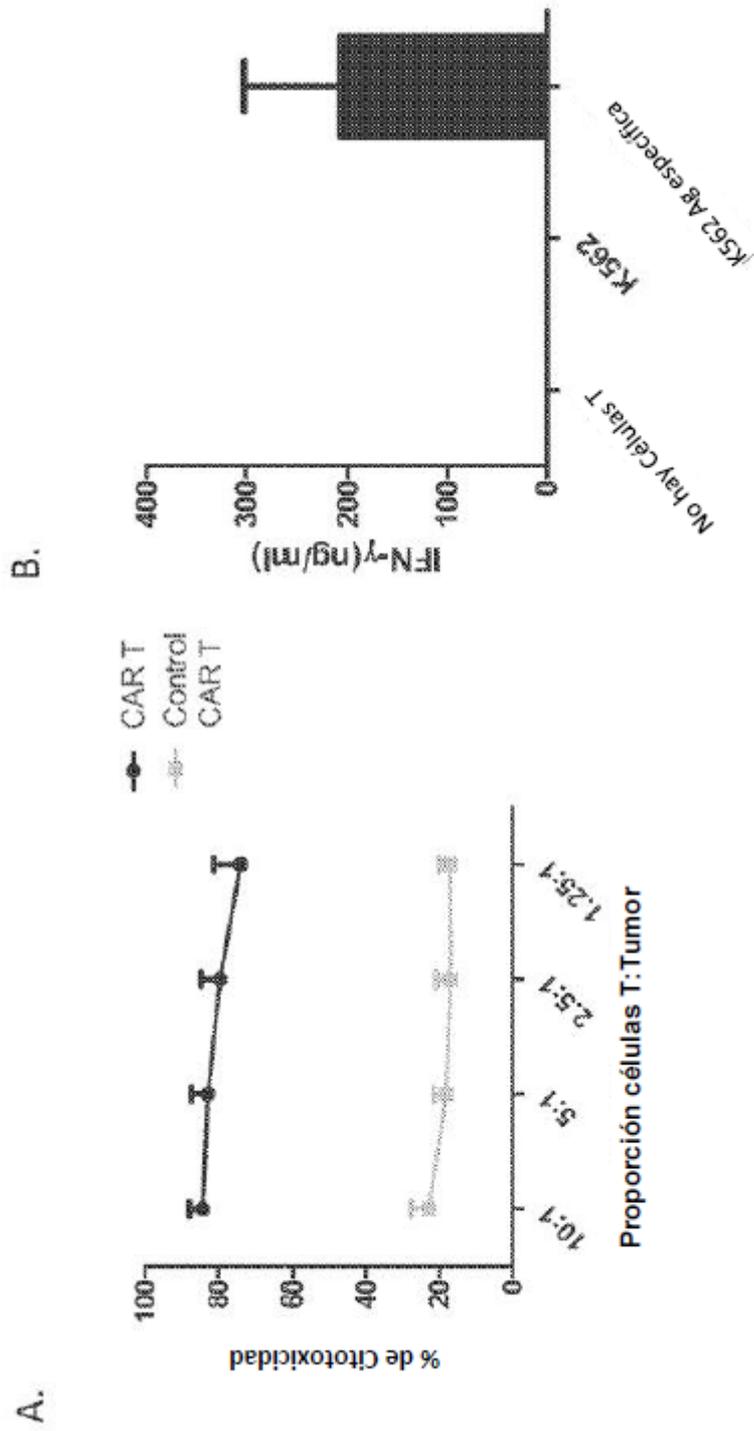


Figura 18