

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 989 838**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/0783** (2010.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**C07K 14/725** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.02.2015 PCT/US2015/014520**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.08.2015 WO15120096**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.02.2015 E 15746399 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2024 EP 3102609**

54 Título: **Métodos para producir células T autólogas útiles para tratar malignidades de células B y otros cánceres y composiciones de las mismas**

30 Prioridad:  
**04.02.2014 US 201461935833 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.11.2024**

73 Titular/es:  
**THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (50.0%)  
Office of Technology Transfer, National Institutes of Health, 6701 Rockledge Drive, Suite 700, MSC 7788  
Bethesda, Maryland 20892-7788, US y  
KITE PHARMA, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:  
**BETTER, MARC;  
FELDMAN, STEVEN A. y  
ROSENBERG, STEVEN A.**

74 Agente/Representante:  
**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 989 838 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Métodos para producir células T autólogas útiles para tratar malignidades de células B y otros cánceres y composiciones de las mismas

5

**DECLARACIÓN DE INTERÉS GUBERNAMENTAL**

[0001] Esta invención se creó en el marco de un Acuerdo de Cooperación en Investigación y Desarrollo con el Instituto Nacional del Cáncer (NCI), una Agencia del Departamento de Salud y Servicios Humanos. El Gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos sobre esta invención.

10

**ANTECEDENTES**

[0002] El proceso de producción de células T autólogas modificadas para su uso en la terapia del cáncer es largo (10-24 días), implica dos ciclos de transducción retroviral y es poco adecuado para aplicaciones comerciales (véase Kochenderfer et al., Blood. 2012 119: 2709-2720; Johnson, et al., Blood. 2009; 114(3):535-546). Por lo tanto, sería deseable desarrollar mejoras en el proceso de fabricación de células T para superar estas limitaciones.

15

**RESUMEN**

20

[0003] En el presente documento se proporciona un método para fabricar células T que expresan un receptor de superficie celular que reconoce una fracción antigénica específica en la superficie de una célula diana, el método comprende (a) enriquecer una población de linfocitos obtenidos de un sujeto donante; (b) estimular la población de linfocitos con uno o más agentes estimulantes de células T para producir una población de células T activadas, en el que la estimulación se realiza en un sistema cerrado utilizando un medio de cultivo libre de suero; (c) transducir la población de células T activadas con un vector viral que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el receptor de superficie celular, utilizando una transducción de ciclo único para producir una población de células T transducidas, en la que la transducción se realiza en un sistema de bolsa cerrada utilizando medio de cultivo libre de suero, en la que la bolsa está recubierta con una proteína de fibronectina humana recombinante o un fragmento de la misma; y (d) expandir la población de células T transducidas durante un tiempo predeterminado para producir una población de células T modificadas por ingeniería, donde la expansión se realiza en un sistema cerrado utilizando medio de cultivo libre de suero. En ciertas realizaciones, el receptor de superficie celular puede ser un receptor de células T (TCR) o un receptor de antígeno quimérico (CAR). En ciertas realizaciones, la célula diana puede ser una célula cancerosa. En ciertas realizaciones, la célula cancerosa puede ser una malignidad de célula B. En ciertas realizaciones, el receptor de superficie celular puede ser un CAR anti-CD19. En ciertas realizaciones, el CAR anti-CD19 puede ser un CAR FMC63-28Z o un CAR FMC63-CD828BBz. En ciertas realizaciones, el uno o más agentes estimulantes de células T pueden ser un anticuerpo anti-CD3 e IL-2. En ciertas realizaciones, el vector viral puede ser un vector retroviral. En ciertas realizaciones, el vector retroviral puede ser un vector retroviral gamma MSGV1. En ciertas realizaciones, el vector retroviral gamma MSGV1 puede ser un vector retroviral gamma MSGV-FMC63-28Z o un vector retroviral gamma MSGV-FMC63-CD828BBz. En ciertas realizaciones, el tiempo predeterminado para expandir la población de células T transducidas puede ser de 3 días. En ciertas realizaciones, el tiempo desde el enriquecimiento de la población de linfocitos hasta la producción de las células T modificadas puede ser de 6 días. En ciertas realizaciones, las células T modificadas pueden utilizarse para tratar a un paciente con cáncer. En ciertas realizaciones, el paciente con cáncer y el sujeto donante pueden ser el mismo individuo. En ciertas realizaciones, el sistema cerrado puede ser un sistema de bolsa cerrada. En ciertas realizaciones, la población de células puede comprender células T naïve. En ciertas realizaciones, aproximadamente 35-43% de la población de células T manipuladas puede comprender células T naïve. En ciertas realizaciones, al menos aproximadamente el 35% de la población de células T modificadas puede comprender células T naïve. En ciertas realizaciones, al menos aproximadamente el 43% de la población de células T modificadas puede comprender células T naïve.

25

30

35

40

45

50

[0004] En el presente documento se describe una población de células T modificadas que expresan un receptor de superficie celular que reconoce una fracción antigénica específica en la superficie de una célula diana producida por los métodos descritos en el presente documento.

55

[0005] En el presente documento se describen composiciones farmacéuticas que comprenden una población de células T modificadas por ingeniería. En el presente documento se describen composiciones farmacéuticas que comprenden la población de células T modificadas por ingeniería descrita en el presente documento. La composición farmacéutica puede comprender una dosis terapéuticamente eficaz de las células T modificadas. El receptor de superficie celular puede ser un receptor de células T (TCR) o un receptor de antígeno quimérico (CAR). El CAR puede ser un FMC63-28Z CAR o un FMC63-CD828BBZ CAR. La dosis terapéuticamente eficaz puede ser de más de aproximadamente 1 millón a menos de aproximadamente 3 millones de células T modificadas por kilogramo de peso corporal (células/kg). La dosis terapéuticamente eficaz puede ser de aproximadamente 2 millones de células T modificadas/kg.

60

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

65

[0006]

La FIG. 1 es un diagrama que ilustra el proceso de fabricación de células T según ciertas realizaciones descritas en el presente documento (el proceso "mejorado"). Dado que los tiempos de duplicación de las células T pueden variar ligeramente de un sujeto a otro, se considera un tiempo de crecimiento adicional más allá de las 72 horas (es decir, de 3 a 6 días) en bolsas en caso de que el número total de células sea insuficiente para administrar una dosis diana de interés (véase \*).

La FIG. 2 es un diagrama que ilustra el proceso mejorado en comparación con un proceso utilizado tradicionalmente (el proceso "anterior") según una realización.

La FIG. 3 es un gráfico de barras que ilustra la expansión del cultivo en el proceso mejorado en comparación con el proceso anterior según una realización. El eje y muestra la expansión en pliegues de las células para cada una de las 5 ejecuciones (eje x). La expansión del cultivo de pliegues es similar entre los procesos anteriores y los mejorados en las corridas de ingeniería a escala.

La FIG. 4 muestra una serie de gráficos que ilustran los fenotipos de células T en el Día 6 y en el Día 10 en los procesos anterior y mejorado para el Fenotipo de Células CD3+ (FIG. 4A) y activación de células CD3+ (FIG. 4B) como se muestra, según una realización. Los fenotipos de las células T son comparables entre el proceso anterior y el mejorado, pero las células del Día 6 están menos diferenciadas. T<sub>eff</sub>= células T efectoras; T<sub>cm</sub>= células T centrales de memoria.

La FIG. 5 muestra una serie de gráficos que ilustran el fenotipo celular en el Día 6 en los procesos anterior y mejorado, según una realización.

La FIG. 6 es un esquema que muestra el recuento diario de células durante las fases de estimulación, transducción y expansión del proceso mejorado, según una realización.

La FIG. 7 muestra la secuencia de ácido nucleico de un esqueleto retroviral gamma MSGV1 (SEQ ID N.º:4) según una realización.

La FIG. 8 muestra la eficacia de transducción en función de la concentración de RetroNectin<sup>®</sup> utilizada para recubrir las bolsas, según una realización. RN= concentración de RetroNectin<sup>®</sup> en µg/mL. Los resultados se midieron el día 6 después de la transducción en bolsas PL07 de 2 donantes.

La FIG. 9 muestra la eficacia de transducción con y sin etapa de lavado, según una realización. Los resultados se midieron el día 6 tras la transducción en bolsas Origen PermaLife<sup>™</sup>.

La FIG. 10 muestra el impacto de la concentración de RetroNectin<sup>®</sup> en la eficacia de la transducción en el medio OpTmizer<sup>™</sup>, según una realización. RN= concentración de RetroNectin<sup>®</sup> en µg/mL. "Abierto" indica la condición en la que la transducción se ejecutó en placas en AIM V<sup>®</sup>+ 5% de suero humano.

La FIG. 11 muestra la actividad de las células T transducidas medida por la expresión de CD107a y la expresión de IFN-gamma tras la coincubación con células CD19+ Nalm6 durante 4 horas, evaluada por FACS, según una realización. "Abierto" indica la condición en la que la transducción se ejecutó en placas en AIM V<sup>®</sup>+ 5% de suero humano. Control T indica una muestra de referencia de PBMC transducidas CAR-positivas congeladas.

La FIG. 12 muestra el perfil de temperatura de la cámara de congelación de tasa controlada (línea inferior) y la temperatura del producto (línea superior) para el perfil optimizado. El perfil mostrado se ha truncado en aras de la brevedad para mostrar sólo la región crítica.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

**[0007]** Se proporciona un método para fabricar preparaciones de células T que pueden ser útiles para tratar pacientes con una enfermedad o afección patológica. En contraste con los métodos de producción conocidos para productos de células T, los métodos y procesos descritos aquí se completan en un tiempo significativamente más corto, aproximadamente 6 días, ofreciendo así una ventaja de tiempo significativa para llevar las células a la clínica. En el presente documento se describen poblaciones de células T modificadas por ingeniería producidas mediante los métodos descritos en el presente documento, y composiciones farmacéuticas de las mismas.

**[0008]** El método aquí proporcionado se utiliza para fabricar células T que expresan un receptor de superficie celular que reconoce una fracción antigénica específica en la superficie de una célula diana. El receptor de superficie celular puede ser un receptor de células T (TCR) de tipo salvaje o recombinante, un receptor de antígeno quimérico (CAR) o cualquier otro receptor de superficie capaz de reconocer una fracción antigénica asociada a la célula diana. La forma de la fracción antigénica reconocida por los CAR y los TCR es ligeramente diferente. Los CAR tienen un fragmento variable de cadena única (scFv) como dominio de unión a la diana, lo que permite la expresión del CAR como proteína de cadena única. Esto permite a un CAR reconocer antígenos cancerígenos nativos que forman parte de una proteína intacta en la superficie de la célula diana. Un TCR tiene dos cadenas de proteínas diseñadas para unirse a péptidos específicos presentados por una proteína MHC en la superficie de determinadas células. Dado que los TCR reconocen péptidos en el contexto de moléculas MHC expresadas en la superficie de una célula diana, los TCR tienen el potencial de reconocer antígenos cancerígenos no sólo presentados directamente en la superficie de células cancerosas, sino también presentados por células presentadoras de antígenos en microambientes tumorales, inflamatorios e infectados, y en órganos linfoides secundarios. Las células presentadoras de antígenos son células nativas del sistema inmunitario responsables de la amplificación de la respuesta inmunitaria.

**[0009]** Por lo tanto, las células T fabricadas que expresan el receptor de superficie celular pueden usarse para dirigirse y matar cualquier célula diana, incluidas, entre otras, células infectadas, células dañadas o células disfuncionales. Ejemplos de tales células diana pueden incluir células cancerosas, células infectadas por virus, células infectadas por bacterias, células inflamatorias activadas disfuncionalmente (por ejemplo, células endoteliales inflamatorias) y células implicadas en

reacciones inmunitarias disfuncionales (por ejemplo, células implicadas en enfermedades autoinmunes).

**[0010]** En algunos aspectos, la fracción antigénica está asociada con un cáncer o una célula cancerosa. Dichas moléculas antigénicas pueden incluir, entre otras, 707-AP (707 alanina prolina), AFP (alfa (a)-fetoproteína), ART-4 (antígeno de adenocarcinoma reconocido por células T4), BAGE (antígeno B; b-catenina/m, b-catenina/mutada), BCMA (antígeno de maduración de células B), Bcr-abl (región de *cluster* de puntos de ruptura-Abelson), CAIX (anhidrasa carbónica IX), CD19 (*cluster* de diferenciación 19), CD20 (*cluster* de diferenciación 20), CD22 (*cluster* de diferenciación 22), CD30 (*cluster* de diferenciación 30), CD33 (*cluster* de diferenciación 33), CD44v7/8 (*cluster* de diferenciación 44, exones 7/8), CAMEL (antígeno reconocido por CTL en melanoma), CAP-1 (péptido de antígeno carcinoembrionario-1), CASP-8 (caspasa-8), CDC27m (ciclo de división celular 27 mutado), CDK4/m (quinasa dependiente de ciclina 4 mutada), CEA (antígeno carcinoembrionario), CT (antígeno cáncer/testis), Cyp-B (ciclofilina B), DAM (antígeno de diferenciación melanoma), EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), EGFRvIII (receptor del factor de crecimiento epidérmico, variante III), EGP-2 (glicoproteína epitelial 2), EGP-40 (glicoproteína epitelial 40), Erbb2, 3, 4 (oncogén viral de la leucemia eritroblástica homólogo-2, -3, 4), ELF2M (factor de elongación 2 mutado), ETV6-AML1 (variante del gen 6 Ets/gen ETS de leucemia mieloide aguda 1) FBP (proteína de unión al folato), fAchR (receptor de acetilcolina fetal), G250 (glicoproteína 250), GAGE (antígeno G), GD2 (disialogangliósido 2), GD3 (disialogangliósido 3), GnT-V (N-acetilglucosaminiltransferasa V), Gp100 (glicoproteína 100kD), HAGE (antígeno helicoidal), HER-2/neu (receptor epidérmico humano-2/neurológico; también conocido como EGFR2), HLA-A (antígeno leucocitario humano-A) HPV (virus del papiloma humano), HSP70-2M (proteína de choque térmico 70 - 2 mutada), HST-2 (tumor humano en anillo de sello - 2), hTERT o hTRT (transcriptasa inversa de la telomerasa humana), iCE (carboxilesterasa intestinal), IL-13R-a2 (subunidad alfa-2 del receptor de la interleucina-13), KIAA0205, KDR (receptor del dominio de inserción de la quinasa), cadena  $\kappa$ -luz, LAGE (antígeno L), LDLR/FUT (receptor de lípidos de baja densidad/GDP-L-fucosa: b-D-galactosidasa 2-a-L-fucosiltransferasa), LeY (anticuerpo Lewis-Y), L1CAM (molécula de adhesión celular L1), MAGE (antígeno de melanoma), MAGE-A1 (antígeno 1 asociado a melanoma), mesotelina, células infectadas por CMV murino, MART-1/Melan-A (antígeno de melanoma reconocido por células T-1/antígeno de melanoma A), MC1R (receptor de melanocortina 1), Miosina/m (miosina mutada), MUC1 (mucina 1), MUM-1, -2, -3 (melanoma ubicuo mutado 1, 2, 3), NA88-A (clon de ADNc del paciente M88), ligandos NKG2D (Grupo 2 de asesinos naturales, miembro D), NY-BR-1 (antígeno 1 de diferenciación mamaria de Nueva York), NY-ESO-1 (Carcinoma esofágico de células escamosas-1 de Nueva York), antígeno oncofetal (h5T4), P15 (proteína 15), p190 minor bcr-abl (proteína de 190KD bcr-abl), Pml/RARa (leucemia promielocítica/receptor a del ácido retinoico), PRAME (antígeno de melanoma expresado preferentemente), PSA (antígeno prostático específico), PSCA (antígeno de células madre prostáticas), PSMA (antígeno de membrana prostático específico), RAGE (antígeno renal), RU1 o RU2 (ubicuo renal 1 o 2), SAGE (antígeno de sarcoma), SART-1 o SART-3 (antígeno escamoso de rechazo tumoral 1 o 3), SSX1, -2, -3, 4 (sarcoma sinovial X1, -2, -3, -4), TAA (antígeno asociado a tumor), TAG-72 (glicoproteína 72 asociada a tumor), TEL/AML1 (translocación leucemia de la familia Ets/leucemia mieloide aguda 1), TPI/m (triosa fosfato isomerasa mutada), TRP-1 (proteína 1 relacionada con la tirosinasa o gp75), TRP-2 (proteína 2 relacionada con la tirosinasa), TRP-2/INT2 (TRP-2/intron 2), VEGF-R2 (receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular) o WT1 (gen del tumor de Wilms).

**[0011]** En algunos aspectos, el receptor de superficie celular es cualquier TCR que reconoce una fracción antigénica específica en células cancerosas, incluyendo, pero sin limitarse a, un TCR anti-707-AP, un TCR anti-AFP, un TCR anti-ART-4, un TCR anti-BAGE, un TCR anti-Bcr-abl, un TCR anti-CAMEL, un TCR anti-CAP-1, un TCR anti-CASP-8, un TCR anti-CDC27m, un TCR anti-CDK4/m, un TCR anti-CEA, un TCR anti-CT, un TCR anti-Cyp-B, un TCR anti-DAM, un TCR anti-EGFRvIII, un TCR anti-ELF2M, un TCR anti-ETV6-AML1, un TCR anti-G250, un TCR anti-GAGE, un TCR anti-GnT-V, un TCR anti-Gp100, un TCR anti-HAGE, un TCR anti-HER-2/neu, un TCR anti-HLA-A, un TCR anti-HPV, un TCR anti-HSP70-2M, un TCR anti-HST-2, un TCR anti-hTERT o un TCR anti-hTRT, un TCR anti-iCE, anti-KIAA0205, anti-LAGE (antígeno L), un TCR anti-LDLR/FUT, un TCR anti-MAGE, un TCR anti-MART-1/Melan-A, un TCR anti-MC1R, un TCR anti-Miosina/m, un TCR anti-MUC1, un TCR anti-MUM-1, -2, -3, un TCR anti-NA88-A, un TCR anti-NY-ESO-1, un TCR anti-P15, un TCR anti-p190 minor bcr-abl, un TCR anti-Pml/RARa, un TCR anti-PRAME, un TCR anti-PSA, un TCR anti-PSMA, un TCR anti-RAGE, un TCR anti-RU1 o un TCR anti-RU2, un TCR anti-SAGE, un TCR anti-SART-1 o un TCR anti-SART-3, un TCR anti-SSX1, -2, -3, 4, un TCR anti-TEL/AML1, un TCR anti-TPI/m, un TCR anti-TRP-1, un TCR anti-TRP-2, un TCR anti-TRP-2/INT2, o un TCR anti-WT1.

**[0012]** En otros aspectos, el receptor de superficie celular es cualquier CAR que pueda ser expresado por una célula T y que reconozca una fracción antigénica específica en células cancerosas. Algunos CAR contienen un dominio de unión al antígeno (por ejemplo, scFv) y un dominio de señalización (por ejemplo, la cadena zeta de CD3). Otros CAR contienen un dominio de unión a antígeno (por ejemplo, scFv), un dominio de señalización (por ejemplo, la cadena zeta de CD3) y un dominio coestimulador (por ejemplo, CD28). Otros CAR contienen un dominio de unión a antígeno (por ejemplo, scFv), un dominio de señalización (por ejemplo, la cadena zeta de CD3) y dos dominios coestimuladores (por ejemplo, CD28 y 4-1BB). Ejemplos de CAR de receptores de superficie que pueden ser expresados por células T que se generan de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento, incluyen, pero no se limitan a, un CAR anti-BCMA, CAR anti-CAIX, CAR anti-CD19, CAR anti-CD20, CAR anti-CD22, CAR anti-CD30, CAR anti-CD33, CAR anti-CD44v7/8, CAR anti-CEA, CAR anti-EGFRvIII, anti-EGP-2, CAR anti-EGP-40, CAR anti-Erbb2, 3, 4, CAR anti-FBP, CAR anti-fAchR, CAR anti-GD2, CAR anti-GD3, CAR anti-HER2/neu, CAR anti-IL-13R-a2, CAR anti-KDR, CAR anti-kde cadena ligera, CAR anti-LeY, CAR anti-L1CAM, CAR anti-MAGE-A1, CAR anti-mesotelina, CAR dirigido a células infectadas con CMV antimurino, CAR anti-MUC1, CAR de ligando anti-NKG2D, CAR anti-NY-BR-1, CAR anti-h5T4, CAR anti-PSCA, CAR anti-PSMA, CAR anti-TAA, CAR anti-TAG-72, o CAR anti-VEGF-R2. En una realización, el receptor de superficie celular es

cualquier CAR anti-CD19. En un aspecto, el CAR anti-CD19 incluye un dominio scFv extracelular, una porción intracelular y/o transmembrana de una molécula CD28, una porción extracelular opcional de la molécula CD28 y un dominio CD3zeta intracelular. El CAR anti-CD19 también puede incluir dominios adicionales, tales como una región extracelular y/o transmembrana CD8, un dominio Fc de inmunoglobulina extracelular (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), o uno o más dominios de señalización adicionales, tales como 41BB, OX40, CD2 CD16, CD27, CD30 CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, receptor IL-2, receptor Fc gamma, o cualquier otro dominio costimulador con motivos de activación basados en tirosina inmunorreceptora.

**[0013]** En ciertas realizaciones, el receptor de superficie celular es un CAR anti-CD19, como el CAR FMC63-28Z o el CAR FMC63-CD828BBZ según se expone en Kochenderfer et al., J Immunother. Septiembre de 2009; 32(7): 689-702, "Construction and Pre-clinical Evaluation of an Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor", que describe los métodos de construcción de los vectores utilizados para producir células T que expresen el CAR FMC63-28Z o el CAR FMC63-CD828BBZ.

**[0014]** En otras realizaciones, la fracción antigénica está asociada con células infectadas viralmente (es decir, una fracción antigénica viral). Dichas moléculas antigénicas pueden incluir, entre otros, un antígeno del virus de Epstein-Barr (VEB) (por ejemplo, EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3, LMP-1, LMP-2), un antígeno del virus de la hepatitis A (por ejemplo, VP1, VP2, VP3), un antígeno del virus de la hepatitis B (por ejemplo, HBsAg, HBcAg, HBeAg), un antígeno del virus de la hepatitis C (por ejemplo, glicoproteínas de envoltura E1 y E2), un antígeno viral del virus del herpes simple tipo 1, tipo 2 o tipo 8 (HSV1, HSV2 o HSV8) (por ejemplo, glicoproteínas gB, gC, gC, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL, gM, UL20, UL32, US43, UL45, UL49A), un antígeno viral del citomegalovirus (CMV) (por ejemplo, glicoproteínas gB, gC, gC, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL, gM u otras proteínas de la envoltura), un antígeno vírico del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (glicoproteínas gp120, gp41, o p24), un antígeno vírico de la gripe (por ejemplo, hemaglutinina (HA) o neuraminidasa (NA)), un antígeno vírico del sarampión o las paperas, un antígeno vírico del virus del papiloma humano (HPV) (por ejemplo, L1, L2), un antígeno vírico del virus de la parainfluenza, un antígeno vírico del virus de la rubéola, un antígeno vírico del virus respiratorio sincitial (RSV) o un antígeno vírico del virus de la varicela-zoster. En tales aspectos, el receptor de superficie celular puede ser cualquier TCR, o cualquier CAR que reconozca cualquiera de los antígenos víricos antes mencionados en una célula diana infectada víricamente.

**[0015]** En otras realizaciones, la fracción antigénica se asocia con células que presentan una disfunción inmunitaria o inflamatoria. Dichas moléculas antigénicas pueden incluir, entre otras, la proteína básica de mielina (MBP), la proteína proteolípídica de mielina (PLP), la glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG), el antígeno carcinoembrionario (CEA), la proinsulina, la glutamina descarboxilasa (GAD65, GAD67), las proteínas de choque térmico (HSP) o cualquier otro antígeno específico de tejido que esté implicado o asociado con un proceso autoinmune patológico.

**[0016]** El método aquí proporcionado incluye una etapa de enriquecimiento de una población de linfocitos obtenidos de un sujeto donante. El sujeto donante puede ser un paciente con cáncer que va a ser tratado con una población de células generada por los métodos aquí descritos (es decir, un donante autólogo), o puede ser un individuo que dona una muestra de linfocitos que, tras la generación de la población de células generada por los métodos aquí descritos, se utilizará para tratar a un individuo o paciente con cáncer diferente (es decir, un donante alogénico). La población de linfocitos puede obtenerse del sujeto donante por cualquier método adecuado utilizado en la técnica. Por ejemplo, la población de linfocitos puede obtenerse por cualquier método extracorpóreo adecuado, venopunción u otro método de extracción de sangre por el que se obtenga una muestra de sangre y/o linfocitos. En una realización, la población de linfocitos se obtiene por aféresis.

**[0017]** El enriquecimiento de una población de linfocitos puede lograrse mediante cualquier método de separación adecuado, incluido, entre otros, el uso de un medio de separación (por ejemplo, Cóctel de enriquecimiento de linfocitos totales HLA Ficoll-Paque™, RosetteSep™, Medio de Separación de Linfocitos (LSA) (MP Biomedical Cat. No. 0850494X), o similares), separación por tamaño, forma o densidad celular por filtración o elutriación, separación inmunomagnética (por ejemplo, sistema de clasificación celular activado por magnetismo, MACS), separación fluorescente (por ejemplo, sistema de clasificación celular activado por fluorescencia, FACS), o separación en columna basada en microesferas.

**[0018]** El método proporcionado en el presente documento también incluye una etapa de estimulación de la población de linfocitos con uno o más agentes estimulantes de células T para producir una población de células T activadas. Puede usarse cualquier combinación de uno o más agentes estimulantes de células T adecuados para producir una población de células T activadas, incluyendo, pero sin limitarse a, un anticuerpo o fragmento funcional del mismo dirigido a una molécula estimuladora o coestimuladora de células T (por ejemplo, anticuerpo anti-CD2, anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD28, o fragmentos funcionales del mismo) una citocina de células T (por ejemplo, cualquier citocina aislada, de tipo salvaje o recombinante, como: interleucina 1 (IL-1), interleucina 2, (IL-2), interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 7 (IL-7), interleucina 15 (IL-15), factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )), o cualquier otro mitógeno adecuado (por ejemplo, acetato de tetradecanoil forbol (TPA), fitohemaglutinina (PHA), concanavalina A (conA), lipopolisacárido (LPS), mitógeno pokeweed (PWM)) o ligando natural a una molécula estimuladora o coestimuladora de células T.

**[0019]** En algunas realizaciones, la etapa de estimular la población de linfocitos como se describe aquí puede comprender estimular la población de linfocitos con uno o más agentes estimulantes de células T a una temperatura predeterminada, durante una cantidad predeterminada de tiempo, y/o en presencia de un nivel predeterminado de CO<sub>2</sub>. En ciertas

realizaciones, la temperatura predeterminada para la estimulación puede ser de aproximadamente 34 °C, aproximadamente 35 °C, aproximadamente 36 °C, aproximadamente 37 °C, aproximadamente 38 °C o aproximadamente 39 °C. En ciertas realizaciones, la temperatura predeterminada para la estimulación puede ser de aproximadamente 34-39 °C. En ciertas realizaciones, la temperatura predeterminada para la estimulación puede ser de aproximadamente 35-37 °C. En ciertas realizaciones, la temperatura predeterminada preferida para la estimulación puede ser de aproximadamente 36-38 °C. En ciertas realizaciones, la temperatura predeterminada para la estimulación puede ser de aproximadamente 36-37 °C o, más preferiblemente, de aproximadamente 37 °C. En ciertas realizaciones, la etapa de estimular la población de linfocitos comprende estimular la población de linfocitos con uno o más agentes estimulantes de células T durante un tiempo predeterminado. En ciertas realizaciones, el tiempo predeterminado para la estimulación puede ser de aproximadamente 24-72 horas. En ciertas realizaciones, el tiempo predeterminado para la estimulación puede ser de aproximadamente 24-36 horas, aproximadamente 30-42 horas, aproximadamente 36-48 horas, aproximadamente 40-52 horas, aproximadamente 42-54 horas, aproximadamente 44-56 horas, aproximadamente 46-58 horas, aproximadamente 48-60 horas, aproximadamente 54-66 horas, o aproximadamente 60-72 horas. En ciertas realizaciones, el tiempo predeterminado para la estimulación puede ser de aproximadamente 48 horas o al menos de aproximadamente 48 horas. En ciertas realizaciones, el tiempo predeterminado para la estimulación puede ser de aproximadamente 44-52 horas. En ciertas realizaciones, el tiempo predeterminado para la estimulación puede ser de aproximadamente 40-44 horas, aproximadamente 40-48 horas, aproximadamente 40-52 horas o aproximadamente 40-56 horas. En ciertas realizaciones, la etapa de estimular la población de linfocitos puede comprender estimular la población de linfocitos con uno o más agentes estimulantes de células T en presencia de un nivel predeterminado de CO<sub>2</sub>. En ciertas realizaciones, el nivel predeterminado de CO<sub>2</sub> para la estimulación puede ser de aproximadamente 1,0-10% de CO<sub>2</sub>. En ciertas realizaciones, el nivel predeterminado de CO<sub>2</sub> para la estimulación puede ser de aproximadamente 1,0%, aproximadamente 2,0%, aproximadamente 3,0%, aproximadamente 4,0%, aproximadamente 5,0%, aproximadamente 6,0%, aproximadamente 7,0%, aproximadamente 8,0%, aproximadamente 9,0% o aproximadamente 10,0% de CO<sub>2</sub>. En ciertas realizaciones, el nivel predeterminado de CO<sub>2</sub> para la estimulación puede ser de aproximadamente 3-7% de CO<sub>2</sub>. En ciertas realizaciones, el nivel predeterminado de CO<sub>2</sub> para la estimulación puede ser de aproximadamente 4-6% de CO<sub>2</sub>. En ciertas realizaciones, el nivel predeterminado de CO<sub>2</sub> para la estimulación puede ser de aproximadamente 4,5-5,5% de CO<sub>2</sub>. En ciertas realizaciones, el nivel predeterminado de CO<sub>2</sub> para la estimulación puede ser de aproximadamente 5% de CO<sub>2</sub>. En algunas realizaciones, la etapa de estimular la población de linfocitos puede comprender estimular la población de linfocitos con uno o más agentes estimulantes de células T a una temperatura predeterminada, durante una cantidad predeterminada de tiempo, y/o en presencia de un nivel predeterminado de CO<sub>2</sub> en cualquier combinación. Por ejemplo, la etapa de estimular la población de linfocitos puede comprender estimular la población de linfocitos con uno o más agentes estimulantes de células T a una temperatura predeterminada de aproximadamente 36-38 °C, durante una cantidad predeterminada de tiempo de aproximadamente 44-52 horas, y en presencia de un nivel predeterminado de CO<sub>2</sub> de aproximadamente 4,5-5,5% de CO<sub>2</sub>.

**[0020]** En ciertas realizaciones, la población de linfocitos que se utiliza para la etapa de estimular la población de linfocitos como se describe en el presente documento puede estar a una concentración predeterminada de linfocitos. En ciertas realizaciones, la concentración predeterminada de linfocitos puede ser de aproximadamente 0,1 - 10,0 × 10<sup>6</sup> células/mL. En ciertas realizaciones, la concentración predeterminada de linfocitos puede ser de aproximadamente 0,1 - 1,0 × 10<sup>6</sup> células/mL, 1,0 - 2,0 × 10<sup>6</sup> células/mL, aproximadamente 1,0 - 3,0 × 10<sup>6</sup> células/mL, aproximadamente 1,0 - 4,0 × 10<sup>6</sup> células/mL, aproximadamente 1,0 - 6,0 × 10<sup>6</sup> células/mL, aproximadamente 1,0 - 7,0 × 10<sup>6</sup> células/mL, aproximadamente 1,0 - 8,0 × 10<sup>6</sup> células/mL, aproximadamente 1,0 - 5,0 × 10<sup>6</sup> células/mL, aproximadamente 1,0 - 6,0 × 10<sup>6</sup> células/mL, aproximadamente 1,0 - 7,0 × 10<sup>6</sup> células/mL, aproximadamente 1,0 - 8,0 × 10<sup>6</sup> células/mL, 1,0 - 9,0 × 10<sup>6</sup> células/mL, o aproximadamente 1,0 - 10,0 × 10<sup>6</sup> células/mL. En ciertas realizaciones, la concentración predeterminada de linfocitos puede ser de aproximadamente 1,0 - 2,0 × 10<sup>6</sup> células/mL. En ciertas realizaciones, la concentración predeterminada de linfocitos puede ser de aproximadamente 1,0 - 1,2 × 10<sup>6</sup> células/mL, aproximadamente 1,0 - 1,4 × 10<sup>6</sup> células/mL, aproximadamente 1,0 - 1,6 × 10<sup>6</sup> células/mL, aproximadamente 1,0 - 1,8 × 10<sup>6</sup> células/mL, o aproximadamente 1,0 - 2,0 × 10<sup>6</sup> células/mL. En ciertas realizaciones, la concentración predeterminada de linfocitos puede ser de al menos aproximadamente 0,1 × 10<sup>6</sup> células/mL, al menos aproximadamente 1,0 × 10<sup>6</sup> células/mL, al menos aproximadamente 1,1 × 10<sup>6</sup> células/mL, al menos aproximadamente 1,2 × 10<sup>6</sup> células/mL, al menos aproximadamente 1,3 × 10<sup>6</sup> células/mL, al menos aproximadamente 1,4 × 10<sup>6</sup> células/mL, al menos aproximadamente 1,5 × 10<sup>6</sup> células/mL, al menos aproximadamente 1,6 × 10<sup>6</sup> células/mL, al menos aproximadamente 1,7 × 10<sup>6</sup> células/mL, al menos aproximadamente 1,8 × 10<sup>6</sup> células/mL, al menos aproximadamente 1,9 × 10<sup>6</sup> células/mL, al menos aproximadamente 2,0 × 10<sup>6</sup> células/mL, al menos aproximadamente 4,0 × 10<sup>6</sup> células/mL, al menos aproximadamente 6,0 × 10<sup>6</sup> células/mL, al menos aproximadamente 8,0 × 10<sup>6</sup> células/mL, o al menos aproximadamente 10,0 × 10<sup>6</sup> células/mL.

**[0021]** En algunas realizaciones, puede utilizarse un anticuerpo anti-CD3 (o fragmento funcional del mismo), un anticuerpo anti-CD28 (o fragmento funcional del mismo), o una combinación de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 de acuerdo con la etapa de estimulación de la población de linfocitos. Puede utilizarse cualquier anticuerpo soluble o inmovilizado anti-CD2, anti-CD3 y/o anti-CD28 o fragmento funcional del mismo (por ejemplo, clon OKT3 (anti-CD3), clon 145-2C11 (anti-CD3), clon UCHT1 (anti-CD3), clon L293 (anti-CD28), clon 15E8 (anti-CD28)). En algunos aspectos, los anticuerpos pueden adquirirse comercialmente de proveedores conocidos en la técnica, incluidos, entre otros, Miltenyi Biotec, BD Biosciences (por ejemplo, MACS GMP CD3 pure 1mg/mL, Part No. 170-076-116), y eBioscience, Inc. Además, un experto en la materia entendería cómo producir un anticuerpo anti-CD3 y/o anti-CD28 por métodos estándar. Cualquier anticuerpo utilizado en los métodos aquí descritos debe producirse según las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) para ajustarse a las directrices de las agencias pertinentes para productos biológicos. En algunas realizaciones, el uno o más agentes

estimulantes de células T que pueden usarse de acuerdo con la etapa de estimular la población de linfocitos incluye un anticuerpo o fragmento funcional del mismo que se dirige a una molécula estimuladora o coestimuladora de células T en presencia de una citocina de células T. En una realización, uno o más agentes estimulantes de células T incluyen un anticuerpo anti-CD3 e IL-2. En ciertas realizaciones, el agente estimulante de células T puede incluir un anticuerpo anti-CD3 a una concentración de aproximadamente 20 ng/mL-100 ng/mL. En ciertas realizaciones, la concentración de anticuerpo anti-CD3 puede ser de aproximadamente 20 ng/mL, aproximadamente 30 ng/mL, aproximadamente 40 ng/mL, aproximadamente 50 ng/mL, aproximadamente 60 ng/mL, aproximadamente 70 ng/mL, aproximadamente 80 ng/mL, aproximadamente 90 ng/mL, o aproximadamente 100 ng/mL. En ciertas realizaciones, la concentración de anticuerpo anti-CD3 puede ser de aproximadamente 50 ng/mL.

**[0022]** El método proporcionado en el presente documento incluye además una etapa de transducción de la población de células T activadas con un vector viral que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el receptor de superficie celular, utilizando una transducción de ciclo único para producir una población de células T transducidas. Se han utilizado varios virus recombinantes como vectores virales para introducir material genético en una célula. Los vectores virales que pueden utilizarse de acuerdo con la etapa de transducción pueden ser cualquier vector viral ecotrópico o anfitriónico, incluidos, entre otros, vectores retrovirales recombinantes, vectores lentivirales recombinantes, vectores adenovirales recombinantes y vectores virales adenoasociados (AAV) recombinantes. En una realización, el vector viral utilizado para transducir la población de células T activadas es un vector retroviral gamma MSGV1. En un aspecto, dicho vector retroviral gamma MSGV1 puede incluir una secuencia de ácido nucleico de base mostrada en la FIG. 6 (SEQ ID N.º:4), en el que un fragmento de ácido nucleico que incluye la secuencia de un receptor de superficie celular (por ejemplo, un CAR o un TCR) se liga con un fragmento de ácido nucleico que incluye la secuencia del vector retroviral gamma MSGV1. En ciertas realizaciones, el vector vírico utilizado para transducir la población de células T activadas puede ser el vector retrovírico MSGV-FMC63-28Z o el vector retrovírico MSGV-FMC63-CD828BBZ según se expone en Kochenderfer et al., J Immunother. Septiembre de 2009; 32(7): 689-702, en el que se describen los métodos de construcción de los vectores retrovirales, tal como se indica en la sección "Construcción de los vectores retrovirales recombinantes MSGV-FMC63-28Z y MSGV-FMC63-CD828BBZ" del apartado "Materiales y métodos" de la publicación. Según un aspecto de esta realización, el vector viral se cultiva en un medio específico para la fabricación de vectores virales. En el inóculo de vectores virales puede utilizarse cualquier medio de crecimiento y/o suplementos adecuados para el cultivo de vectores virales de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento. Según algunos aspectos, el vector viral puede añadirse entonces a los medios de cultivo sin suero descritos a continuación durante la etapa de transducción.

**[0023]** En ciertas realizaciones, la etapa de transducir la población de células T activadas puede realizarse durante un tiempo predeterminado, a una temperatura predeterminada y/o en presencia de un nivel predeterminado de CO<sub>2</sub>. En ciertas realizaciones, la temperatura predeterminada para la transducción puede ser de aproximadamente 34 °C, aproximadamente 35 °C, aproximadamente 36 °C, aproximadamente 37 °C, aproximadamente 38 °C o aproximadamente 39 °C. En ciertas realizaciones, la temperatura predeterminada para la transducción puede ser de aproximadamente 34-39 °C. En ciertas realizaciones, la temperatura predeterminada para la transducción puede ser de aproximadamente 35-37 °C. En ciertas realizaciones, la temperatura predeterminada preferida para la transducción puede ser de aproximadamente 36-38 °C. En ciertas realizaciones, la temperatura predeterminada para la transducción puede ser de aproximadamente 36-37 °C o, más preferiblemente, de aproximadamente 37 °C. En ciertas realizaciones, el tiempo predeterminado para la transducción puede ser de aproximadamente 12-36 horas. En ciertas realizaciones, el tiempo predeterminado para la transducción puede ser de aproximadamente 12-16 horas, aproximadamente 12-20 horas, aproximadamente 12-24 horas, aproximadamente 12-28 horas o aproximadamente 12-32 horas. En ciertas realizaciones, el tiempo predeterminado para la transducción puede ser de aproximadamente 20 horas o al menos de aproximadamente 20 horas. En ciertas realizaciones, el tiempo predeterminado para la transducción puede ser de aproximadamente 16-24 horas. En ciertas realizaciones, el tiempo predeterminado para la transducción puede ser de al menos aproximadamente 14 horas, al menos aproximadamente 16 horas, al menos aproximadamente 18 horas, al menos aproximadamente 20 horas, al menos aproximadamente 22 horas, al menos aproximadamente 24 horas o al menos aproximadamente 26 horas. En algunas realizaciones, la etapa de transducir la población de células T activadas puede comprender transducir la población de células T activadas con un vector viral a un nivel predeterminado de CO<sub>2</sub>. En ciertas realizaciones, el nivel predeterminado de CO<sub>2</sub> para la transducción puede ser de aproximadamente 1,0-10% de CO<sub>2</sub>. En ciertas realizaciones, el nivel predeterminado de CO<sub>2</sub> para la transducción puede ser de aproximadamente 1,0%, aproximadamente 2,0%, aproximadamente 3,0%, aproximadamente 4,0%, aproximadamente 5,0%, aproximadamente 6,0%, aproximadamente 7,0%, aproximadamente 8,0%, aproximadamente 9,0% o aproximadamente 10,0% de CO<sub>2</sub>. En ciertas realizaciones, el nivel predeterminado de CO<sub>2</sub> para la transducción puede ser de aproximadamente 3-7% de CO<sub>2</sub>. En ciertas realizaciones, el nivel predeterminado de CO<sub>2</sub> para la transducción puede ser de aproximadamente 4-6% de CO<sub>2</sub>. En ciertas realizaciones, el nivel predeterminado de CO<sub>2</sub> para la transducción puede ser de aproximadamente 4,5-5,5% de CO<sub>2</sub>. En ciertas realizaciones, el nivel predeterminado de CO<sub>2</sub> para la transducción puede ser de aproximadamente el 5% de CO<sub>2</sub>. En algunas realizaciones, la etapa de transducción de la población de células T activadas puede realizarse durante un tiempo predeterminado, a una temperatura predeterminada y/o en presencia de un nivel predeterminado de CO<sub>2</sub> en cualquier combinación. Por ejemplo, la etapa de transducir la población de células T activadas puede comprender una temperatura predeterminada de aproximadamente 36-38 °C, durante una cantidad predeterminada de tiempo de aproximadamente 16-24 horas, y en presencia de un nivel predeterminado de CO<sub>2</sub> de aproximadamente 4,5-5,5% de CO<sub>2</sub>.

**[0024]** El método proporcionado en el presente documento incluye además una etapa de expansión de la población de

células T transducidas durante un tiempo predeterminado para producir una población de células T de ingeniería. El tiempo predeterminado para la expansión puede ser cualquier tiempo adecuado que permita la producción de (i) un número suficiente de células en la población de células T de ingeniería para al menos una dosis para administrar a un paciente, (ii) una población de células T de ingeniería con una proporción favorable de células juveniles en comparación con un proceso típico más largo, o (iii) ambos (i) y (ii). Este tiempo dependerá del receptor de superficie celular expresado por las células T, del vector utilizado, de la dosis necesaria para obtener un efecto terapéutico y de otras variables. Así, en algunas realizaciones, el tiempo predeterminado para la expansión puede ser de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días, 16 días, 17 días, 18 días, 19 días, 20 días, 21 días, o más de 21 días. En algunos aspectos, el tiempo predeterminado para la expansión es más corto que los métodos de expansión conocidos en la técnica. Por ejemplo, el tiempo predeterminado para la expansión puede ser más corto en al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, o puede ser más corto en más de un 75%. En una realización, el tiempo predeterminado para la expansión es de aproximadamente 3 días. En este aspecto, el tiempo desde el enriquecimiento de la población de linfocitos hasta la producción de las células T manipuladas es de aproximadamente 6 días. En ciertas realizaciones, la etapa de expandir la población de células T transducidas puede realizarse a una temperatura predeterminada y/o en presencia de un nivel predeterminado de CO<sub>2</sub>. En ciertas realizaciones, la temperatura predeterminada puede ser de aproximadamente 34 °C, aproximadamente 35 °C, aproximadamente 36 °C, aproximadamente 37 °C, aproximadamente 38 °C o aproximadamente 39 °C. En ciertas realizaciones, la temperatura predeterminada puede ser de aproximadamente 34-39 °C. En ciertas realizaciones, la temperatura predeterminada puede ser de aproximadamente 35-37 °C. En ciertas realizaciones, la temperatura predeterminada preferida puede ser de aproximadamente 36-38 °C. En ciertas realizaciones, la temperatura predeterminada puede ser de aproximadamente 36-37 °C o, más preferiblemente, de aproximadamente 37 °C. En algunas realizaciones, la etapa de expandir la población de células T transducidas puede comprender expandir la población de células T transducidas en presencia de un nivel predeterminado de CO<sub>2</sub>. En ciertas realizaciones, el nivel predeterminado de CO<sub>2</sub> puede ser de 1,0-10% de CO<sub>2</sub>. En ciertas realizaciones, el nivel predeterminado de CO<sub>2</sub> puede ser de aproximadamente 1,0%, aproximadamente 2,0%, aproximadamente 3,0%, aproximadamente 4,0%, aproximadamente 5,0%, aproximadamente 6,0%, aproximadamente 7,0%, aproximadamente 8,0%, aproximadamente 9,0% o aproximadamente 10,0% de CO<sub>2</sub>. En ciertas realizaciones, el nivel predeterminado de CO<sub>2</sub> puede ser de aproximadamente 4,5-5,5% de CO<sub>2</sub>. En ciertas realizaciones, el nivel predeterminado de CO<sub>2</sub> puede ser de aproximadamente el 5% de CO<sub>2</sub>. En ciertas realizaciones, el nivel predeterminado de CO<sub>2</sub> puede ser de aproximadamente 3,5%, aproximadamente 4,0%, aproximadamente 4,5%, aproximadamente 5,0%, aproximadamente 5,5% o aproximadamente 6,5% de CO<sub>2</sub>. En algunas realizaciones, la etapa de expandir la población de células T transducidas puede realizarse a una temperatura predeterminada y/o en presencia de un nivel predeterminado de CO<sub>2</sub> en cualquier combinación. Por ejemplo, la etapa de expansión de la población de células T transducidas puede comprender una temperatura predeterminada de aproximadamente 36-38 °C y en presencia de un nivel predeterminado de CO<sub>2</sub> de aproximadamente 4,5-5,5% de CO<sub>2</sub>.

**[0025]** En algunos aspectos, cada paso de los métodos aquí descritos se realiza en un sistema cerrado. En ciertas realizaciones, el sistema cerrado es un sistema de cultivo en bolsa cerrada, que puede utilizar cualquier bolsa de cultivo celular adecuada (por ejemplo, bolsas de Diferenciación Celular Mitenyi Biotec MACS<sup>®</sup> GMP, bolsas de Cultura Celular Origen Biomedical PermaLife<sup>™</sup>). En algunas realizaciones, las bolsas de cultivo celular utilizadas en el sistema de cultivo en bolsa cerrada se recubren con una proteína de fibronectina humana recombinante durante la etapa de transducción. En ciertas realizaciones, las bolsas de cultivo celular utilizadas en el sistema de cultivo en bolsa cerrada se recubren con un fragmento de proteína de fibronectina humana recombinante durante la etapa de transducción. El fragmento de fibronectina humana recombinante puede incluir tres dominios funcionales: un dominio central de unión a células, un dominio II de unión a heparina y una secuencia CS1. La proteína de fibronectina humana recombinante o un fragmento de la misma puede utilizarse para aumentar la eficacia génica de la transducción retroviral de células inmunitarias al favorecer la co-localización de las células diana y el vector viral. En ciertas realizaciones, el fragmento de fibronectina humana recombinante es RetroNectin<sup>®</sup> (Takara Bio, Japón). En ciertas realizaciones, las bolsas de cultivo celular pueden recubrirse con fragmento de fibronectina humana recombinante a una concentración de aproximadamente 1-60 µg/mL, preferiblemente 1-40 µg/mL. En ciertas realizaciones, las bolsas de cultivo celular pueden recubrirse con fragmento de fibronectina humana recombinante a una concentración de aproximadamente 1-20 µg/mL, 20-40 µg/mL, o 40-60 µg/mL. En ciertas realizaciones, las bolsas de cultivo celular pueden estar recubiertas con aproximadamente 1 µg/mL, aproximadamente 2 µg/mL, aproximadamente 3 µg/mL, aproximadamente 4 µg/mL, aproximadamente 5 µg/mL, aproximadamente 6 µg/mL, aproximadamente 7 µg/mL, aproximadamente 8 µg/mL, aproximadamente 9 µg/mL, aproximadamente 10 µg/mL, aproximadamente 11 µg/mL, aproximadamente 12 µg/mL, aproximadamente 13 µg/mL, aproximadamente 14 µg/mL, aproximadamente 15 µg/mL, aproximadamente 16 µg/mL, aproximadamente 17 µg/mL, aproximadamente 18 µg/mL, aproximadamente 19 µg/mL, o aproximadamente 20 µg/mL de fragmento de fibronectina humana recombinante. En ciertas realizaciones, las bolsas de cultivo celular pueden recubrirse con aproximadamente 2-5 µg/mL, aproximadamente 2-10 µg/mL, aproximadamente 2-20 µg/mL, aproximadamente 2-25 µg/mL, aproximadamente 2-30 µg/mL, aproximadamente 2-35 µg/mL, aproximadamente 2-40 µg/mL, aproximadamente 2-50 µg/mL, o aproximadamente 2-60 µg/mL de fragmento de fibronectina humana recombinante. En ciertas realizaciones, las bolsas de cultivo celular pueden recubrirse con al menos aproximadamente 2 µg/mL, al menos aproximadamente 5 µg/mL, al menos aproximadamente 10 µg/mL, al menos aproximadamente 15 µg/mL, al menos aproximadamente 20 µg/mL, al

menos aproximadamente 25 µg/mL, al menos aproximadamente 30 µg/mL, al menos aproximadamente 40 µg/mL, al menos aproximadamente 50 µg/mL, o al menos aproximadamente 60 µg/mL de fragmento de fibronectina humana recombinante. En ciertas realizaciones, las bolsas de cultivo celular pueden recubrirse con al menos aproximadamente 10 µg/mL de fragmento de fibronectina humana recombinante. En ciertas realizaciones, las bolsas de cultivo celular utilizadas en el sistema de cultivo en bolsa cerrada pueden bloquearse con suero de albúmina humana (HSA) durante la etapa de transducción. En una realización alternativa, las bolsas de cultivo celular no se bloquean con HSA durante la etapa de transducción. Como se menciona en el presente documento, el término "medio libre de suero" o "medio de cultivo libre de suero" significa que el medio de crecimiento utilizado no está suplementado con suero (por ejemplo, suero humano o suero bovino). En otras palabras, no se añade suero al medio de cultivo como ingrediente separado y distinto con el fin de favorecer la viabilidad, la activación y el crecimiento de las células cultivadas. Para cultivar las células en suspensión de acuerdo con los métodos aquí descritos, puede utilizarse cualquier medio de cultivo T adecuado. Por ejemplo, un medio de crecimiento de células T puede incluir, entre otros, una solución estéril baja en glucosa que incluya una cantidad adecuada de tampón, magnesio, calcio, piruvato sódico y bicarbonato sódico. En una realización, el medio de crecimiento de células T es OpTmizer™ (Life Technologies), pero un experto en la materia entendería cómo generar medios similares. A diferencia de los métodos típicos de producción de células T modificadas por ingeniería, los métodos aquí descritos utilizan un medio de cultivo que no está suplementado con suero (por ejemplo, humano o bovino).

**[0026]** El método para fabricar células T que expresan un receptor de superficie celular que reconoce una fracción antigénica específica en la superficie de una célula diana proporcionado en el presente documento comprende (1) enriquecer una población de linfocitos obtenidos de un sujeto donante; (2) estimular la población de linfocitos con uno o más agentes estimulantes de células T para producir una población de células T activadas, en donde la estimulación se realiza en un sistema cerrado usando un medio de cultivo libre de suero; (3) transducir la población de células T activadas con un vector viral que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el receptor de superficie celular, utilizando una transducción de ciclo único para producir una población de células T transducidas, en la que la transducción se realiza en un sistema de bolsa cerrada utilizando un medio de cultivo libre de suero en el que la bolsa está recubierta con una proteína de fibronectina humana recombinante o un fragmento de la misma; y (4) expandir la población de células T transducidas durante un tiempo predeterminado para producir una población de células T modificadas por ingeniería, donde la expansión se realiza en un sistema cerrado utilizando un medio de cultivo libre de suero.

**[0027]** En una realización, el método puede incluir, pero no se limita a, (1) recogida de producto de aféresis de un paciente y separación de las células mononucleares en un sistema cerrado, (2) estimulación de la población de células mononucleares con un anticuerpo contra CD3 en presencia de IL2 para estimular el crecimiento celular de células T en un sistema cerrado, (3) transducción de un nuevo gen receptor de superficie celular que permite a las células T reconocer una fracción antigénica específica en la superficie de las células diana cancerosas utilizando un vector retroviral gamma en un sistema cerrado, (4) expansión de las células T transducidas en un sistema cerrado, (5) y lavado y preparación de las células T autólogas expandidas en un sistema cerrado para su readministración a un paciente con cáncer. En algunas realizaciones, la etapa de expansión es de 3 días, lo que permite completar todo el proceso de fabricación en menos de una semana. Los pasos 2-4 del proceso en los que las células T crecen activamente se realizan en un medio de cultivo celular definido que no contiene suero humano (es decir, medio libre de suero). Las células T producidas por este proceso muestran actividad biológica y se activan por el antígeno diana en la superficie de las células cancerosas y producen interferón gamma en respuesta. Algunos aspectos de los métodos aquí descritos incluyen:

- Este proceso tiene lugar en un sistema cerrado en el que la probabilidad de contaminación durante la fabricación de células T es mínima;
- El proceso es adecuado para la producción de células T para aplicaciones clínicas;
- Las células se propagan en un medio de cultivo celular que no contiene suero humano;
- El gen receptor se introduce en las células T en un sistema de bolsa cerrada;
- Las células pueden prepararse para uso clínico en sólo 6 días; y
- Las células muestran una actividad biológica indicativa de actividad biológica *in vivo*.

**[0028]** Estos aspectos proporcionan varias distinciones y/o mejoras con respecto a los métodos que se utilizan actualmente en este campo, como se indica a continuación. El uso de un medio de cultivo celular libre de suero humano minimiza las oportunidades de introducción de patógenos humanos a partir de materias primas en el proceso, y evita el uso de una materia prima que puede no estar fácilmente disponible en el futuro. Además, este uso favorece el cumplimiento de las GMP, ya que los diferentes lotes de suero requieren importantes pruebas de cultivo y liberación para garantizar la reproducibilidad y la solidez del proceso. El crecimiento de células T en medio libre de suero ha sido reportado previamente (Carstens et al., reunión ISCT en San Diego, 2012; Zuliani, 2011), pero no se ha incorporado previamente en un proceso para la producción de células T para uso clínico para tratar el cáncer, y el trabajo previo no ha demostrado que la activación, transducción y expansión de células T en medio libre de suero sea robusta. En el proceso mejorado contemplado en los estudios aquí descritos, se mantuvo el uso de un anticuerpo monoclonal anti-CD3 y de IL2 para la estimulación de las poblaciones de células T. Además, el cultivo celular en bolsas de sistema cerrado proporcionaría una ventaja significativa para evitar la posible contaminación durante el cultivo celular y ofrecería un proceso simplificado y acortado que es adecuado para la fabricación cGMP y la comercialización del producto. La importancia de esta aplicación práctica es significativa, ya que muchos procesos descritos en la literatura para la propagación de células T no son adecuados para aplicaciones comerciales generalizadas.

5 **[0029]** Anteriormente, la transducción viral con un vector retroviral gamma no ha sido eficiente, y se ha realizado un proceso abierto denominado "espinoculación" en placas de microtitulación, en el que el virus y las células se centrifugaban en el fondo de un pocillo que había sido recubierto con RetroNectin®. Este proceso suele repetirse dos veces en días consecutivos para maximizar la eficacia de la transducción. Este paso de transducción se modificó de acuerdo con algunas realizaciones de los métodos aquí descritos, de modo que la transducción se lleva a cabo en un sistema de bolsa cerrada, utilizando una bolsa (en lugar de una placa) que había sido recubierta con RetroNectin®, y que el proceso se ejecuta una sola vez en lugar de dos. Los métodos aquí descritos también pueden implicar la propagación de células en bolsas de cultivo celular de sistema cerrado en lugar de matraces de sistema abierto como se había utilizado históricamente en el campo. Aunque algunas publicaciones incluyen informes de transducción en sistemas de bolsas (Lamers et al., Cancer Gene Therapy 2002, 9: 613-623; Lamers et al., Cytotherapy 2008, 10: 406-416; Tumanini et al.), estos casos -a diferencia de los métodos aquí descritos- incluyen al menos dos transducciones que se habían completado en medio de cultivo celular que contenía suero, y un tiempo de expansión de al menos 9 días. Los estudios de desarrollo aquí descritos demuestran que la transducción en bolsas en medio libre de suero no sólo es factible, sino que los niveles de transducción son aceptables para el desarrollo clínico posterior tras una única transducción y una expansión de sólo 3 días.

20 **[0030]** La población de células T modificadas producidas por los métodos descritos anteriormente puede criopreservarse opcionalmente para que las células puedan utilizarse en una fecha posterior. Así pues, en el presente documento se describe un método de criopreservación de una población de células T modificadas por ingeniería. Dicho método puede incluir una etapa de lavado y concentración de la población de células T modificadas con una solución diluyente. En algunos aspectos, la solución diluyente es solución salina normal, solución salina al 0,9%, PlasmaLyte A (PL), solución salina al 5% de dextrosa/0,45% NaCl (D5), albúmina sérica humana (HSA) o una combinación de las mismas. En algunos aspectos, puede añadirse HSA a las células lavadas y concentradas para mejorar la viabilidad celular y la recuperación celular tras la descongelación. En otro aspecto, la solución de lavado es solución salina normal y a las células lavadas y concentradas se les añade HSA (5%). El método también puede incluir una etapa de generación de una mezcla de criopreservación, en la que la mezcla de criopreservación incluye la población diluida de células en la solución diluyente y una solución criopreservante adecuada. En algunos aspectos, la solución criopreservante puede ser cualquier solución criopreservante adecuada, incluida, entre otras, CryoStor10 (BioLife Solution), mezclada con la solución diluyente de células T manipuladas en una proporción de 1:1 o 2:1. Puede añadirse HSA para obtener una concentración final de aproximadamente 1,0-10% de HSA en la mezcla criopreservada. La HSA puede añadirse para proporcionar una concentración final de aproximadamente 1,0%, aproximadamente 2,0%, aproximadamente 3,0%, aproximadamente 4,0%, aproximadamente 5,0%, aproximadamente 6,0%, aproximadamente 7,0%, aproximadamente 8,0%, aproximadamente 9,0% o aproximadamente 10,0% de HSA en la mezcla criopreservada. La HSA puede añadirse para proporcionar una concentración final de aproximadamente 1-3% de HSA, aproximadamente 1-4% de HSA, aproximadamente 1-5% de HSA, aproximadamente 1-7% de HSA, aproximadamente 2-4% de HSA, aproximadamente 2-5% de HSA, aproximadamente 2-6% de HSA, o aproximadamente 2-7% de HSA en la mezcla criopreservada. Puede añadirse HSA para obtener una concentración final de aproximadamente el 2,5% de HSA en la mezcla criopreservada. Por ejemplo, la criopreservación de una población de células T de ingeniería puede comprender lavar las células con solución salina normal al 0,9%, añadir HSA a una concentración final del 5% a las células lavadas, y diluir las células 1:1 con CryoStor™ CS10 (para una concentración final del 2,5% de HSA en la mezcla final de criopreservación). El método también puede incluir una etapa de congelación de la mezcla de criopreservación. En un aspecto, la mezcla de criopreservación se congela en un congelador de velocidad controlada utilizando un ciclo de congelación definido a una concentración celular de entre 1e6 y 1,5e7 células por mL de mezcla de criopreservación. El método también puede incluir una etapa de almacenamiento de la mezcla de criopreservación en nitrógeno líquido en fase vapor.

45 **[0031]** La población de células T modificadas producidas por los métodos aquí descritos puede criopreservarse a una dosis predeterminada. La dosis predeterminada puede ser una dosis terapéuticamente eficaz, que puede ser cualquier dosis terapéuticamente eficaz como se describe a continuación. La dosis predeterminada de células T manipuladas puede depender del receptor de superficie celular expresado por las células T (por ejemplo, la afinidad y densidad de los receptores de superficie celular expresados en la célula), el tipo de célula diana, la naturaleza de la enfermedad o afección patológica tratada, o una combinación de ambos. En ciertas realizaciones, el receptor de superficie celular expresado por las células T manipuladas puede ser un CAR anti-CD19, como el CAR FMC63-28Z o el CAR FMC63-CD828BBZ según se expone en Kochenderfer et al., J Immunother. Septiembre de 2009; 32(7): 689-702, que describe métodos de construcción de los vectores utilizados para producir células T que expresan un CAR FMC63-28Z o un CAR FMC63-CD828BBZ. La dosis predeterminada de células T de ingeniería que expresan un CAR FMC63-28Z o un CAR FMC63-CD828BBZ puede ser de más de aproximadamente 1 millón a menos de aproximadamente 3 millones de células T de ingeniería transducidas/kg. La dosis predeterminada de células T de ingeniería que expresan un CAR FMC63-28Z o un CAR FMC63-CD828BBZ puede ser de más de aproximadamente 1 millón a aproximadamente 2 millones de células T de ingeniería transducidas por kilogramo de peso corporal (células/kg). La dosis predeterminada de células T de ingeniería que expresan un CAR FMC63-28Z o un CAR FMC63-CD828BBZ puede ser de más de 1 millón a aproximadamente 2 millones de células T de ingeniería transducidas por kilogramo de peso corporal (células/kg). La dosis predeterminada de células T de ingeniería que expresan un CAR FMC63-28Z o un CAR FMC63-CD828BBZ puede ser de al menos aproximadamente 2 millones a menos de aproximadamente 3 millones de células T de ingeniería transducidas/kg. La dosis predeterminada preferida de células T de ingeniería que expresan un CAR FMC63-28Z o un CAR FMC63-CD828BBZ puede ser de aproximadamente 2 millones de células T de ingeniería transducidas/kg. La dosis predeterminada de células T de ingeniería que expresan un CAR FMC63-28Z o un CAR FMC63-CD828BBZ puede ser

de al menos aproximadamente 2 millones de células T de ingeniería transducidas/kg. La dosis predeterminada de células T transducidas que expresan un CAR FMC63-28Z o un CAR FMC63-CD828BBZ puede ser de aproximadamente 2,0 millones, aproximadamente 2,1 millones, aproximadamente 2,2 millones, aproximadamente 2,3 millones, aproximadamente 2,4 millones, aproximadamente 2,5 millones, aproximadamente 2,6 millones, aproximadamente 2,7 millones, aproximadamente 2,8 millones o aproximadamente 2,9 millones de células T transducidas/kg. La población de células T de ingeniería puede criopreservarse a una dosis predeterminada de aproximadamente 1 millón de células T de ingeniería por kilogramo de peso corporal (células/kg). La población de células T modificadas puede criopreservarse a una dosis predeterminada de entre 500.000 y 1 millón de células T modificadas/kg. La población de células T modificadas puede criopreservarse a una dosis predeterminada de al menos aproximadamente 1 millón, al menos aproximadamente 2 millones, al menos aproximadamente 3 millones, al menos aproximadamente 4 millones, al menos aproximadamente 5 millones, al menos aproximadamente 6 millones, al menos aproximadamente 7 millones, al menos aproximadamente 8 millones, al menos aproximadamente 9 millones, al menos aproximadamente 10 millones de células T modificadas/kg. En otros aspectos, la población de células T manipuladas puede criopreservarse a una dosis predeterminada de menos de 1 millón de células/kg, 1 millón de células/kg, 2 millones de células/kg, 3 millones de células/kg, 4 millones de células/kg, 5 millones de células/kg, 6 millones de células/kg, 7 millones de células/kg, 8 millones de células/kg, 9 millones de células/kg, 10 millones de células/kg, más de 10 millones de células/kg, más de 20 millones de células/kg, más de 30 millones de células/kg, más de 40 millones de células/kg, más de 50 millones de células/kg, más de 60 millones de células/kg, más de 70 millones de células/kg, más de 80 millones de células/kg, más de 90 millones de células/kg, o más de 100 millones de células/kg. La población de células T modificadas puede criopreservarse a una dosis predeterminada de entre 1 millón y 2 millones de células T modificadas/kg. La población de células T manipuladas puede criopreservarse a una dosis predeterminada entre 1 millón de células y 2 millones de células/kg, 1 millón de células y 3 millones de células/kg, 1 millón de células y 4 millones de células/kg, 1 millón de células y 5 millones de células/kg, 1 millón de células y 6 millones de células/kg, 1 millón de células y 7 millones de células/kg, 1 millón de células y 8 millones de células/kg, 1 millón de células y 9 millones de células/kg, 1 millón de células y 10 millones de células/kg. La dosis predeterminada de la población de células T manipuladas puede calcularse en función del peso corporal del sujeto. La población de células T modificadas puede criopreservarse en aproximadamente 0,5-200 ml de medio de criopreservación. La población de células T modificadas puede criopreservarse en aproximadamente 0,5 mL, aproximadamente 1,0 mL, aproximadamente 5,0 mL, aproximadamente 10,0 mL, aproximadamente 20 mL, aproximadamente 30 mL, aproximadamente 40 mL, aproximadamente 50 mL, aproximadamente 60 mL, aproximadamente 70 mL, aproximadamente 80 mL, aproximadamente 90 mL o aproximadamente 100 mL de medio de criopreservación. La población de células T modificadas puede criopreservarse en aproximadamente 10-30 ml, aproximadamente 10-50 ml, aproximadamente 10-70 ml, aproximadamente 10-90 ml, aproximadamente 50-70 ml, aproximadamente 50-90 ml, aproximadamente 50-110 ml, aproximadamente 50-150 ml o aproximadamente 100-200 ml de medio de criopreservación. La población de células T modificadas puede criopreservarse preferentemente en aproximadamente 50-70 ml de medio de criopreservación.

**[0032]** Los métodos descritos en el presente documento se utilizan para producir una población de células T manipuladas que pueden utilizarse para tratar una enfermedad o afección patológica en un sujeto que padece la enfermedad o afección patológica mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz o una dosis terapéuticamente eficaz de las células T manipuladas al sujeto. Como tal, una población de células T de ingeniería que expresan un receptor de superficie celular que reconoce una fracción antigénica específica en la superficie de una célula diana puede ser producida por un método proporcionado en el presente documento. Las afecciones patógenas que pueden tratarse con células T modificadas que se producen mediante los métodos descritos en el presente documento incluyen, entre otras, el cáncer, la infección vírica, la inflamación aguda o crónica, la enfermedad autoinmunitaria o cualquier otra disfunción inmunitaria. En una realización, las células T modificadas se utilizan en el tratamiento de un paciente con cáncer, en el que el paciente con cáncer y el sujeto donante son preferiblemente el mismo individuo. Pueden encontrarse ejemplos de tratamiento de pacientes con dosis de células T manipuladas en Kochenderfer, et al., J Clin Oncol. 2014 (titulado "Chemotherapy-Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Indolent B-Cell Malignancies Can Be Effectively Treated With Autologous T Cells Expressing an Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor") y Kochenderfer et al. Blood. 2012 Mar 22;119(12):2709-20 (titulado "B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells"), que ofrecen detalles sobre las prácticas habituales de tratamiento de pacientes con dosis de células T manipuladas.

**[0033]** La población de células T de ingeniería producidas por los métodos descritos anteriormente puede comprender una o más subpoblaciones de células. La una o más subpoblaciones de células pueden incluir, sin limitación, células T naive, células T efectoras, células T de memoria efectoras y/o células T de memoria central. Como se proporciona en el Ejemplo 2 a continuación, fue inesperado que el uso de los métodos descritos en el presente documento, además de simplemente disminuir la duración del cultivo de 10 días o más a 6 días, daría lugar a una distribución de células T más juvenil con una mayor representación de células T naive y una menor representación de células T efectoras diferenciadas. En ciertas realizaciones, la población de células T manipuladas puede comprender una subpoblación de células T naive. En ciertas realizaciones, al menos aproximadamente el 34-43% de la población de células T manipuladas puede comprender una subpoblación de células T naive. En ciertas realizaciones, al menos aproximadamente el 35% de la población de células T manipuladas puede comprender una subpoblación de células T naive. En ciertas realizaciones, al menos aproximadamente el 40% de la población de células T manipuladas puede comprender una subpoblación de células T naive. En ciertas realizaciones, al menos aproximadamente el 34%, al menos aproximadamente el 35%, al menos aproximadamente el 36%, al menos aproximadamente el 37%, al menos aproximadamente el 38%, al menos aproximadamente el 39%, al menos aproximadamente el 40%, al menos aproximadamente el 41%, al menos

aproximadamente el 42%, al menos aproximadamente el 43%, o al menos aproximadamente el 44% de la población de células T manipuladas puede comprender una subpoblación de células T naive. En ciertas realizaciones, la población de células T modificadas puede comprender una subpoblación de células T de memoria central. En ciertas realizaciones, aproximadamente el 15% o menos de la población de células T manipuladas puede comprender una subpoblación de células T de memoria central. En ciertas realizaciones, aproximadamente 15% o menos, aproximadamente 14% o menos, aproximadamente 13% o menos, aproximadamente 12% o menos, aproximadamente 11% o menos de la población de células T manipuladas puede comprender una subpoblación de células T de memoria central.

**[0034]** Tal como se menciona en el presente documento, un "cáncer" puede ser cualquier cáncer que esté asociado con un antígeno de superficie o marcador de cáncer, incluyendo, pero sin limitarse a, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mielóide aguda (AML), carcinoma adenóide quístico, adrenocortical, carcinoma, cánceres relacionados con el AIDS, cáncer anal, cáncer de apéndice, astrocitomas, tumor teratoide/rabdoide atípico, sistema nervioso central, leucemia de células B, linfoma u otras malignidades de células B, carcinoma basocelular, cáncer de vías biliares, cáncer de vejiga, cáncer óseo, osteosarcoma e histiocitoma fibroso maligno, glioma de tronco encefálico, tumores cerebrales, cáncer de mama, tumores bronquiales, linfoma de Burkitt, tumores carcinoídes, cánceres del sistema nervioso central, cáncer de cuello uterino, cordoma, leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mielógena crónica (CML), trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de colon, cáncer colorrectal, craneofaringioma, linfoma cutáneo de células T, tumores embrionarios, sistema nervioso central, cáncer de endometrio, ependimoblastoma, ependimoma, cáncer de esófago, estesonuroblastoma, tumores de la familia del sarcoma de ewing tumor extracraneal de células germinales, tumor extragonadal de células germinales cáncer de vías biliares extrahepáticas, cáncer ocular histiocitoma fibroso óseo maligno, y osteosarcoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico (estómago), tumor carcinoíde gastrointestinal, tumores del estroma gastrointestinal (GIST), sarcoma de tejidos blandos, tumor de células germinales, tumor trofoblástico gestacional, glioma, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de corazón, cáncer hepatocelular (hígado), histiocitosis, linfoma de Hodgkin, cáncer hipofaríngeo, melanoma intraocular, tumores de células de los islotes (páncreas endocrino), sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, histiocitosis de células de Langerhans, cáncer de laringe, leucemia, cáncer de labio y cavidad oral, cáncer de hígado (primario), carcinoma lobulillar in situ (CLIS), cáncer de pulmón, linfoma, macroglobulinemia, cáncer de mama masculino, histiocitoma fibroso maligno óseo y osteosarcoma, meduloblastoma, meduloepitelioma, melanoma, carcinoma de células de Merkel, mesotelioma, cáncer escamoso metastásico de cuello con carcinoma primario oculto del tracto medio con afectación del gen NUT, cáncer de boca, síndromes de neoplasia endocrina múltiple, mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas, micosis fungoide, síndromes mielodisplásicos, neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas, leucemia mielógena crónica (CML), leucemia mielóide aguda (AML), mieloma múltiple, trastornos mieloproliferativos, cáncer de cavidad nasal y senos paranasales, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, linfoma no Hodgkin, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer oral, cáncer de cavidad oral, cáncer orofaríngeo, osteosarcoma e histiocitoma fibroso maligno óseo, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, papilomatosis, paraganglioma, cáncer de seno paranasal y cavidad nasal, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, cáncer de faringe, feocromocitoma, tumores del parénquima pineal de diferenciación intermedia, pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, tumor hipofisario, neoplasia de células plasmáticas/mieloma múltiple, blastoma pleuropulmonar, embarazo y cáncer de mama, linfoma primario del sistema nervioso central (CNS), cáncer de próstata, cáncer de recto, cáncer de células renales (riñón), pelvis renal y uréter, cáncer de células transicionales, retinoblastoma, rbdomiosarcoma, cáncer de glándulas salivales, sarcoma, síndrome de Sézary, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, carcinoma de células escamosas, cáncer escamoso de cuello, cáncer de estómago (gástrico), tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, linfoma de células t, cutáneo, cáncer de testículo, cáncer de garganta, timoma y carcinoma tímico, cáncer de tiroides, cáncer de células transicionales de pelvis renal y uréter, tumor trofoblástico, cáncer de uréter y pelvis renal, cáncer de uretra, cáncer de útero, sarcoma uterino, cáncer de vagina, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenström, tumor de Wilms.

**[0035]** En algunos aspectos, el cáncer es una malignidad de células B. Algunos ejemplos de malignidades de células B son los linfomas no Hodgkins Lymphomas (NHL), Linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), Linfoma linfocítico pequeño (SLL/CLL), Linfoma de células del manto (MCL), Linfoma folicular (FL), Linfoma de zona marginal (MZL), Extranodal (linfoma MALT), Nodal (linfoma monocitoide de células B), Esplénico, Linfoma difuso de células grandes, Leucemia/linfoma linfocítico crónico de células B, Linfoma de Burkitt y Linfoma linfoblástico de células B.

**[0036]** Como se menciona aquí, una "infección viral" puede ser una infección causada por cualquier virus que cause una enfermedad o condición patológica en el huésped. Ejemplos de infecciones víricas que pueden tratarse con las células T manipuladas que se producen mediante los métodos descritos en el presente documento incluyen, entre otros, una infección vírica causada por un virus de Epstein-Barr (EBV); una infección vírica causada por un virus de la hepatitis A, un virus de la hepatitis B o un virus de la hepatitis C; una infección vírica causada por un virus del herpes simple tipo 1, un virus del herpes simple tipo 2 o un virus del herpes simple tipo 8, una infección vírica causada por un citomegalovirus (CMV), una infección vírica causada por un virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), una infección vírica causada por un virus de la gripe una infección vírica causada por un virus del sarampión o de las paperas, una infección vírica causada por un virus del papiloma humano (HPV), una infección vírica causada por un virus de la parainfluenza, una infección vírica causada por un virus de la rubéola, una infección vírica causada por un virus respiratorio sincitial (RSV) o una infección vírica causada por un virus de la varicela-zóster. En algunos aspectos, una infección vírica puede provocar o resultar en el desarrollo de cáncer en un sujeto con la infección vírica (por ejemplo, la infección por HPV puede causar o estar asociada con el desarrollo de varios tipos de cáncer, incluidos los cánceres de cuello de útero, vulva, vagina, pene, ano y orofaringe, y la infección por HIV puede causar el desarrollo del sarcoma de Kaposi).

5 [0037] Ejemplos de enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades autoinmunes o cualquier otra disfunción inmunitaria que pueden tratarse con las células T modificadas producidas por los métodos descritos en el presente documento incluyen, entre otras, la esclerosis múltiple, el lupus y la psoriasis.

10 [0038] El término "tratar", "en tratamiento" o "tratamiento", tal como se utiliza en el presente documento con respecto a una afección o enfermedad, puede referirse a prevenir una afección o enfermedad, ralentizar el inicio o la tasa de desarrollo de la afección o enfermedad, reducir el riesgo de desarrollar la afección o enfermedad, prevenir o retrasar el desarrollo de los síntomas asociados con la afección o enfermedad, reducir o poner fin a los síntomas asociados con la afección o enfermedad, generar una regresión completa o parcial de la afección o enfermedad, o alguna combinación de los mismos.

15 [0039] Una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "dosis terapéuticamente eficaz" es una cantidad de células T modificadas que producen un efecto terapéutico deseado en un sujeto, como prevenir o tratar una afección diana o aliviar los síntomas asociados a la afección matando las células diana. Los resultados más efectivos en términos de eficacia del tratamiento en un sujeto determinado variarán en función de diversos factores, entre los que se incluyen las características de las células T modificadas (longevidad, actividad, farmacocinética, farmacodinámica y biodisponibilidad), el estado fisiológico del sujeto (edad, sexo, tipo y estadio de la enfermedad, estado físico general, capacidad de respuesta a una dosis determinada y tipo de medicación), la naturaleza de cualquier portador o portadores farmacéuticamente aceptables en cualquier composición utilizada y la vía de administración. Una dosis terapéuticamente eficaz de células T manipuladas también depende del receptor de superficie celular expresado por las células T (por ejemplo, la afinidad y densidad de los receptores de superficie celular expresados en la célula), el tipo de célula diana, la naturaleza de la enfermedad o afección patológica tratada, o una combinación de ambos. Por lo tanto, en algunos aspectos, una dosis terapéuticamente eficaz de células T transducidas por ingeniería es de aproximadamente 1 millón a aproximadamente 2 millones de células T transducidas por ingeniería por kilogramo de peso corporal (células/kg). Por lo tanto, en algunos aspectos, una dosis terapéuticamente eficaz de células T transducidas por ingeniería es de aproximadamente 1 millón a aproximadamente 3 millones de células T transducidas por ingeniería/kg. En ciertos aspectos, la dosis terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 2 millones de células T transducidas/kg. En ciertos aspectos, la dosis terapéuticamente eficaz es de al menos aproximadamente 2 millones de células T transducidas/kg. En ciertos aspectos, la dosis terapéuticamente eficaz es de al menos aproximadamente 1 millón, al menos aproximadamente 2 millones, al menos aproximadamente 3 millones, al menos aproximadamente 4 millones, al menos aproximadamente 5 millones, al menos aproximadamente 6 millones, al menos aproximadamente 7 millones, al menos aproximadamente 8 millones, al menos aproximadamente 9 millones, al menos aproximadamente 10 millones de células T modificadas/kg. En otros aspectos, la dosis terapéuticamente eficaz puede ser inferior a 1 millón de células/kg, 1 millón de células/kg, 2 millones de células/kg, 3 millones de células/kg, 4 millones de células/kg, 5 millones de células/kg, 6 millones de células/kg, 7 millones de células/kg, 8 millones de células/kg, 9 millones de células/kg, 10 millones de células/kg, más de 10 millones de células/kg, más de 20 millones de células/kg, más de 30 millones de células/kg, más de 40 millones de células/kg, más de 50 millones de células/kg, más de 60 millones de células/kg, más de 70 millones de células/kg, más de 80 millones de células/kg, más de 90 millones de células/kg, o más de 100 millones de células/kg. En otros aspectos, la dosis terapéuticamente eficaz puede estar comprendida entre aproximadamente 1 millón de células y aproximadamente 2 millones de células/kg, aproximadamente 1 millón de células y aproximadamente 3 millones de células/kg, aproximadamente 1 millón de células y aproximadamente 4 millones de células/kg, aproximadamente 1 millón de células y aproximadamente 5 millones de células/kg, aproximadamente 1 millón de células y aproximadamente 6 millones de células/kg, aproximadamente 1 millón de células y aproximadamente 7 millones de células/kg, aproximadamente 1 millón de células y aproximadamente 8 millones de células/kg, aproximadamente 1 millón de células y aproximadamente 9 millones de células/kg, aproximadamente 1 millón de células y aproximadamente 10 millones de células/kg. En algunos aspectos, la dosis total terapéuticamente eficaz (células transducidas por paciente) puede ser tan alta como aproximadamente  $1e6$  células transducidas, entre aproximadamente  $1e6$  y aproximadamente  $1e7$  células transducidas, entre aproximadamente  $1e7$  y aproximadamente  $1e8$  células transducidas, entre aproximadamente  $1e8$  y aproximadamente  $1e9$  células transducidas, entre aproximadamente  $1e9$  y aproximadamente  $1e10$  células transducidas, entre aproximadamente  $1e10$  y aproximadamente  $1e11$  células transducidas, aproximadamente  $1e11$  células transducidas, o más de aproximadamente  $1e11$  células transducidas. En un aspecto, la dosis terapéuticamente eficaz puede estar entre aproximadamente  $1e8$  y aproximadamente  $2e8$  células transducidas. Un experto en las artes clínicas y farmacológicas podrá determinar una cantidad terapéuticamente eficaz mediante la experimentación rutinaria, es decir, controlando la respuesta de un sujeto a la administración de un compuesto y ajustando la dosis en consecuencia. En ciertas realizaciones, el receptor de superficie celular expresado por las células T modificadas es un CAR anti-CD19. El CAR anti-CD19 puede ser un CAR FMC63-28Z o un CAR FMC63-CD828BBZ como se establece en Kochenderfer et al., J Immunother. Septiembre de 2009; 32(7): 689-702, que describe métodos de construcción de los vectores utilizados para producir células T que expresan un CAR FMC63-28Z o un CAR FMC63-CD828BBZ. La dosis terapéuticamente eficaz de células T de ingeniería que expresan un CAR FMC63-28Z o un CAR FMC63-CD828BBZ puede ser de más de aproximadamente 1 millón a menos de aproximadamente 3 millones de células T de ingeniería transducidas por kilogramo de peso corporal (células/kg). La dosis terapéuticamente eficaz de células T de ingeniería que expresan un CAR FMC63-28Z o un CAR FMC63-CD828BBZ puede ser de más de 1 millón a aproximadamente 2 millones de células T de ingeniería transducidas por kilogramo de peso corporal (células/kg). La dosis terapéuticamente eficaz de células T transducidas que expresan un CAR FMC63-28Z o un CAR FMC63-CD828BBZ puede ser de aproximadamente 2 millones a menos de aproximadamente 3 millones de células T transducidas/kg. En ciertos aspectos, la dosis terapéuticamente eficaz de células T de ingeniería que expresan un CAR FMC63-28Z o un CAR

5 FMC63-CD828BBZ es de aproximadamente 2,0 millones, aproximadamente 2,1 millones, aproximadamente 2,2 millones, aproximadamente 2,3 millones, aproximadamente 2,4 millones, aproximadamente 2,5 millones, aproximadamente 2,6 millones, aproximadamente 2,7 millones, aproximadamente 2,8 millones o aproximadamente 2,9 millones de células T de ingeniería transducidas/kg. La dosis terapéuticamente eficaz preferida de células T modificadas que expresan un CAR FMC63-28Z o un CAR FMC63-CD828BBZ es de aproximadamente 2 millones de células T modificadas transducidas/kg. En ciertos aspectos, la dosis terapéuticamente eficaz de células T de ingeniería que expresan un CAR FMC63-28Z o un CAR FMC63-CD828BBZ es de al menos aproximadamente 2 millones de células T de ingeniería transducidas/kg.

10 **[0040]** Una composición farmacéutica puede comprender una población de células T modificadas producidas por los métodos descritos en el presente documento. La composición farmacéutica también puede incluir un portador farmacéuticamente aceptable. Un portador farmacéuticamente aceptable puede ser un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable que participa en el acarreo o transporte de células de interés desde un tejido, órgano o porción del cuerpo a otro tejido, órgano o porción del cuerpo. Por ejemplo, el portador puede ser un relleno líquido o sólido, un diluyente, un excipiente, un disolvente o un material de encapsulación, o alguna combinación de los mismos. Cada  
15 componente del soporte debe ser "farmacéuticamente aceptable", es decir, debe ser compatible con los demás ingredientes de la formulación. También debe ser adecuado para el contacto con cualquier tejido, órgano o porción del cuerpo que pueda encontrar, lo que significa que no debe conllevar un riesgo de toxicidad, irritación, respuesta alérgica, inmunogenicidad o cualquier otra complicación que supere excesivamente sus beneficios terapéuticos.

20 **[0041]** El término "aproximadamente", tal como se utiliza en el presente documento, significa dentro del 5% o 10% de un valor establecido o de un intervalo de valores.

#### EJEMPLO 1: Preparación de *ex vivo* células autólogas genéticamente modificadas

25 **[0042]** En la Figura 1 se ofrece una visión general de un proceso ejemplar de fabricación de células T (el proceso "mejorado"). Este proceso mejorado incluye mejoras con respecto a un proceso tradicional de fabricación de células T (el proceso "anterior") (véase la FIG. 2 que ilustran estas mejoras) manteniendo las características del producto de células T. Concretamente, el proceso mejorado es un proceso cerrado que inesperadamente es capaz de eliminar el uso de suero. Además, este proceso mejorado utiliza una transducción de ciclo único para producir una población de células T transducidas. Además, las células que se someten a expansión durante un total de 6 días mediante este proceso muestran un perfil inmunofenotípico más juvenil en comparación con las células que se someten a expansión durante 10 días. Este proceso es capaz de fabricar de forma reproducible un producto con un número objetivo de células T transfectadas que expresan un receptor de antígeno quimérico (CAR) para, por ejemplo, CD19; sin embargo, estos métodos se aplican a células T transducidas con cualquier CAR.  
30

35 **[0043]** En concreto, el proceso está diseñado para ser compatible con el producto de aféresis recogido mediante equipos y procedimientos de aféresis estándar, enriquecer la aféresis del sujeto en linfocitos y activar las células T del sujeto durante un periodo de cultivo definido en presencia de IL-2 recombinante y anticuerpo anti CD3, proporcionar un entorno de cultivo *ex vivo* en el que las células T sobrevivan y proliferen de forma selectiva, transfectar las células T del sujeto utilizando un vector retroviral diseñado para expresar un receptor de antígeno quimérico CD19 dentro de un intervalo consistente de eficiencia de transfección, reducir las impurezas relacionadas con el producto a niveles consistentes (las impurezas relacionadas con el producto incluyen células no T en el material de partida del sujeto), y reducir las impurezas relacionadas con el proceso a niveles consistentes (las impurezas relacionadas con el proceso incluyen medios de crecimiento, citoquinas y otros reactivos del proceso).  
40

45 **[0044]** *Recogida por Aféresis.* Se recogieron glóbulos blancos (leucaféresis) utilizando un equipo de aféresis estándar, como Cobe® Spectra, Spectra Optia®, Fenwal™ Amicus® o equivalente. En el proceso de leucaféresis se obtenían normalmente entre 200 y 400 ml de producto de aféresis de los pacientes. El producto de aféresis puede someterse al proceso de fabricación *in situ*, u opcionalmente enviarse a 1-10°C a una instalación para someterse al proceso de fabricación en un lugar diferente. Otras etapas del proceso pueden llevarse a cabo en una sala de procesos de cultivo celular ISO 7 (o en un entorno similar de tipo sala blanca), como se indica en la Figura 1.  
50

**[0045]** *Reducción de volumen.* Cuando procedía, se realizaba una etapa de reducción del volumen del proceso mejorado utilizando un instrumento de procesamiento celular como el instrumento de laboratorio Sepax® 2 (Biosafe SA; Houston, TX) o equivalente, y se llevaba a cabo utilizando un kit de tubería aséptica estándar. Dada la variabilidad en el número de células y el volumen del material fuente entrante de cada sujeto (aproximadamente 200-400 mL), la etapa de reducción de volumen está diseñada para estandarizar el volumen de células a aproximadamente 120 mL. En el caso de que el volumen de aféresis sea inferior a 120 mL, no es necesario realizar la etapa de reducción de volumen, y las células pasan directamente a la etapa de enriquecimiento linfocitario. La etapa de reducción de volumen está diseñada para estandarizar el volumen de células recibidas de cada sujeto, retener las células mononucleares, lograr un rendimiento celular consistente y una alta viabilidad celular, y mantener un sistema cerrado para minimizar el riesgo de contaminación.  
55

60 **[0046]** *Enriquecimiento de linfocitos.* Tras la etapa de reducción de volumen, las células se sometieron a una separación basada en Ficoll en un instrumento de procesamiento celular, como el Sepax® 2 o equivalente, utilizando el protocolo de separación desarrollado y recomendado por el fabricante del instrumento (NeatCell Program) y utilizando un kit de tubería aséptica estándar. La etapa de enriquecimiento de linfocitos reduce las impurezas relacionadas con el producto, como los  
65

glóbulos rojos y los granulocitos, enriquece y concentra las células mononucleares, lava y reduce los residuos relacionados con el proceso, como el ficoll, y formula las células en medios de crecimiento como preparación para la activación celular, además de lograr un rendimiento celular constante y una alta viabilidad celular. El sistema cerrado minimiza la contaminación ambiental.

5

**[0047]** El proceso puede llevarse a cabo en un área ISO 7 a temperatura ambiente y todas las conexiones pueden realizarse utilizando un soldador de tubos estériles, o bien llevarse a cabo en una campana de flujo laminar ISO 5.

10

**[0048]** *Activación de células T.* La etapa de Activación de Células T puede llevarse a cabo con células recién procesadas procedentes del Enriquecimiento Linfocitario, o con células previamente criopreservadas. En el caso de que se utilicen células criopreservadas, las células pueden descongelarse utilizando protocolos desarrollados antes de su uso.

15

**[0049]** la etapa de activación de células T activa selectivamente las células T para que se vuelvan receptivas a la transducción del vector retroviral, reduce la población viable de todos los demás tipos de células, logra un rendimiento celular consistente y una alta viabilidad de las células T, y mantiene un sistema cerrado para minimizar el riesgo de contaminación.

20

**[0050]** *Lavado 1.* Tras la etapa de activación de células T, las células se lavaron utilizando un equipo de procesamiento celular, como el Sepax<sup>®</sup> 2 o equivalente, con medios de cultivo frescos en un kit aséptico estándar utilizando protocolos desarrollados por el fabricante. Las células se concentraron opcionalmente hasta un volumen final de aproximadamente 100 mL en preparación para la transducción del vector retroviral. La etapa Lavado 1 reduce los residuos relacionados con el proceso, como el anticuerpo anti-CD3, los medios de crecimiento gastados y los restos celulares; consigue un rendimiento celular consistente y una alta viabilidad de las células T, mantiene un sistema cerrado para minimizar el riesgo de contaminación; y concentra y entrega un número suficiente de células T viables en un pequeño volumen apropiado para el inicio de la transducción.

25

30

**[0051]** *Transducción retroviral.* Las células activadas procedentes de la etapa de lavado 1 en medio de crecimiento celular fresco se transfirieron a una bolsa de cultivo celular (Origen Biomedical PL240 o comparable) que se había preparado previamente recubriendo primero las bolsas con una fibronectina recombinante o fragmentos de la misma, como RetroNectin<sup>®</sup> (Takara Bio, Japón), y posteriormente se incubaron con el vector retroviral de acuerdo con los procedimientos definidos antes de la introducción de las células activadas. El recubrimiento con RetroNectin<sup>®</sup> (10 µg/mL) se llevó a cabo a una temperatura de 2-8 °C durante 20± 4 h, se lavó con tampón diluido y posteriormente se incubó con el vector retroviral descongelado durante aproximadamente 180 - 210 min a 37± 1 °C y 5 ± 0,5% de CO<sub>2</sub>. Tras añadir las células a la bolsa, la transducción se llevó a cabo durante 20 ± 4 h a 37 ± 1 °C y 5 ± 0,5% de CO<sub>2</sub>. La etapa de transducción retroviral cultiva las células T activadas en presencia del vector retroviral en condiciones controladas para permitir que tenga lugar una transducción eficiente, consigue un rendimiento celular constante y una alta viabilidad celular, y mantiene un sistema cerrado para minimizar el riesgo de contaminación.

35

40

**[0052]** *Lavado 2.* Tras la etapa de transducción retroviral, las células se lavaron con medio de crecimiento fresco utilizando un equipo de procesamiento celular, como el Sepax<sup>®</sup> 2 o equivalente, en un kit aséptico estándar utilizando protocolos desarrollados por el fabricante, y las células se concentraron hasta un volumen final de aproximadamente 100 mL en preparación para la etapa de expansión. La etapa de Lavado 2 está diseñada para reducir los residuos relacionados con el proceso, como las partículas de vectores retrovirales, los residuos del proceso de producción de vectores, los medios de crecimiento gastados y los restos celulares, lograr un rendimiento celular constante y una alta viabilidad celular; mantener un sistema cerrado para minimizar el riesgo de contaminación; y cambiar los medios de crecimiento gastados por medios frescos con un número objetivo de células en un volumen especificado apropiado para el inicio de la etapa de expansión.

45

50

**[0053]** *Expansión de células T.* Las células de la etapa Lavado 2 se transfirieron asépticamente a una bolsa de cultivo (Origen Biomedical PL325 o equivalente) y se diluyeron con medio de crecimiento celular fresco y se cultivaron durante aproximadamente 72 h a 37 ± 1 °C y 5 ± 0,5% de CO<sub>2</sub>. La densidad celular se midió diariamente a partir del día 5. Dado que los tiempos de duplicación de las células T pueden variar ligeramente de un sujeto a otro, puede ser necesario un tiempo de crecimiento adicional más allá de las 72 horas (es decir, de 3 a 6 días) en caso de que el número total de células sea insuficiente para administrar una dosis objetivo de células T CAR positivas/kg de peso del sujeto. La etapa de expansión de células T está diseñada para cultivar las células en condiciones controladas con el fin de producir un número suficiente de células transducidas para administrar una dosis eficaz, mantener un sistema cerrado para minimizar el riesgo de contaminación y lograr un rendimiento celular consistente y una alta viabilidad celular. Una de estas dosis eficaces o dosis diana incluye 2 × 10<sup>6</sup> células T CAR FMC63-28Z positivas o FMC63-CD828BBZ CAR positivas/kg (± 20%) de peso del sujeto que se produjeron mediante transducción con el vector retroviral MSGV-FMC63-28Z o el vector retroviral MSGV-FMC63-CD828BBZ, respectivamente, ambos descritos en detalle en Kochenderfer et al., J Immunother. Septiembre de 2009; 32(7): 689-702

55

60

65

**[0054]** *Lavado 3 y Concentrado.* Tras la etapa de expansión de células T, las células se lavaron con solución salina al 0,9% utilizando un instrumento de procesamiento celular, como el Sepax<sup>®</sup> 2 o equivalente, en un kit aséptico estándar utilizando protocolos desarrollados por el fabricante, y las células se concentraron hasta un volumen final de aproximadamente 35 mL en preparación para la formulación y criopreservación. La etapa de lavado 3 está diseñada para

reducir los residuos relacionados con el proceso, como los residuos del proceso de producción retroviral, los medios de crecimiento gastados y los restos celulares; lograr un rendimiento celular constante y una alta viabilidad celular; y mantener un sistema cerrado para minimizar el riesgo de contaminación.

5 **[0055]** Una vez que las células han sido concentradas y lavadas en solución salina al 0,9%, puede formularse una dosis celular adecuada para la preparación del producto criopreservado final. Las células se prepararon para la criopreservación y se criopreservaron de acuerdo con los métodos proporcionados a continuación en el Ejemplo 4.

## 10 **EJEMPLO 2: Crecimiento de células T expandidas en bolsas de cultivo celular**

10 **[0056]** Las realizaciones descritas en el presente documento proporcionan una producción eficiente de una terapia de células T autólogas de ingeniería en 6 días. Se lograron las siguientes mejoras con respecto a la técnica anterior un proceso acortado a 6 días en lugar de 24, 14 o 10 días como se utilizaba anteriormente (esto reduce el número de pruebas necesarias para la liberación del producto (incluidas las pruebas RCR)); productos de células T mejorados, incluida una mayor proporción de células T juveniles para una mayor potencia y eficacia; un cultivo que puede iniciarse con un mayor número de células para compensar el menor tiempo de fabricación; un sistema cerrado en el que realizar los pasos de los métodos aquí descritos; la identificación de condiciones de cultivo sin suero humano que favorezcan el crecimiento de células T; la transducción de retrovirus de ciclo único en bolsas; la activación y expansión del cultivo celular realizada en bolsas en lugar de en matraces; y el suministro de un producto congelado. Estas mejoras se utilizaron para el desarrollo y la comercialización de nuevas terapias con células T autólogas de sangre periférica (eACT) para el tratamiento de múltiples indicaciones oncológicas. Las células T resultantes del programa de desarrollo mantuvieron el mismo perfil fenotípico y de actividad que las células propagadas por métodos anteriores.

25 **[0057]** *Generación de células T de ingeniería.* La figura 2 muestra una visión general del proceso de fabricación de células T con las mejoras aquí descritas en el proceso mejorado. Brevemente, se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de sujetos con malignidades de células B mediante aféresis, se dividieron y se procesaron una al lado de la otra utilizando técnicas anteriores y las técnicas mejoradas descritas en el presente documento. Cinco estudios evaluaron todos los pasos del proceso hasta el crecimiento en el Día 6, pero no las operaciones finales de lavado y criopreservación. En dos estudios adicionales, el proceso mejorado se ejecutó desde el procesamiento inicial del material de aféresis hasta los pasos finales de formulación y congelación, de nuevo utilizando producto de aféresis de pacientes con linfoma.

35 **[0058]** El producto de aféresis (o "muestra") se enriqueció en linfocitos mediante separación Ficoll de las PBMC por un proceso Sepax 2 cerrado. A continuación, los linfocitos se cultivaron en bolsas de cultivo cerradas en medio libre de suero (OpTmizer™, Life Technologies) suplementado con un suplemento de prototipo de desarrollo (T cell SR Media Supplement, Life Technologies) y se estimularon para la activación de células T con anticuerpo anti-CD3 y rIL-2 (IL-2 recombinante) durante 48 horas (días 0-2). A continuación, las células T activadas se lavaron mediante un proceso Sepax 2 cerrado.

40 **[0059]** En los días 2-3 del proceso de fabricación, las células T activadas fueron transducidas con un CAR anti-CD19 utilizando un vector retroviral gamma. La transducción se realizó en un sistema cerrado de la siguiente manera. Se recubrió una bolsa de cultivo celular cerrada (es decir, la bolsa Origen PermaLife™ PL240) con RetroNectin® a 2-10 µg/mL, luego se retiró la RetroNectin® y se lavó la bolsa con solución salina tamponada. A continuación, se introdujo el retrovirus gamma en la bolsa del sistema cerrado, seguido de un período de incubación. A continuación, las células T activadas se añadieron directamente a la bolsa que contenía el vector retroviral y se incubaron durante toda la noche a 37 °C. El material de la bolsa de cultivo recubierta de RetroNectin® se retiró y se colocó en una bolsa de cultivo celular separada para la expansión celular. Puede añadirse una etapa de lavado opcional antes de la expansión celular. Las células T transducidas se expandieron en un sistema de bolsa cerrada sin antibióticos durante 3 días (días 3-6). Las células T modificadas resultantes se recogieron y criopreservaron (la criopreservación es una etapa opcional).

50 **[0060]** *Fenotipo de células T de ingeniería.* Las células T modificadas se analizaron mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) para (i) confirmar la expresión del gen CAR, (ii) confirmar la pureza de la población de células T y (iii) determinar los fenotipos celulares presentes en la población de células T modificadas mediante la expresión en la superficie celular de los marcadores de subconjuntos de células T CCR7, CD45RA, CD62L y los marcadores de competencia funcional CD27 y CD28.

55 **[0061]** *Actividad de células T de ingeniería.* Las células T manipuladas también se analizaron mediante un bioensayo de co-cultivo *in vitro* para medir la producción de interferón gamma (IFNγ) por las células T manipuladas tras el co-cultivo con células diana positivas al antígeno (Ag) (es decir, CD19+). También se analizó mediante FACS la producción intracelular de interferón gamma (IFNγ) por parte de las células T manipuladas y la expresión de CD107a tras el co-cultivo con células diana Ag positivas.

60 **[0062]** *Estudios de crecimiento.* El crecimiento y la viabilidad de las células T se evaluaron en cada experimento para garantizar que el crecimiento celular fuera sólido, consistente y similar (o mejor) que el de los estudios convencionales.

65 **[0063]** *Criopreservación.* Las células se lavaron el día 6 con solución salina normal, después se añadió HSA al 5%, y las células se mezclaron 1:1 con CryoStor™ 10 (BioLife Solutions™). A continuación, las células se congelaron en un

congelador de velocidad controlada utilizando un ciclo de congelación definido, y después se almacenaron en nitrógeno líquido en fase vapor. Se ha demostrado que mediante este proceso se pueden criopreservar y descongelar con éxito células de entre  $1 \times 10^6$  y  $1,5 \times 10^7$  por mL. La solución salina con HSA fue tan buena o mejor que otras soluciones probadas (por ejemplo, PL/D5), y la HSA mejoró la recuperación de la congelación-descongelación.

[0064] Se evaluó la viabilidad de las células en el momento de la descongelación mediante exclusión con azul tripán y FACS (tinción basada en FACS para Annexin V y 7AAD). Las células conservaron su fenotipo y su función biológica, medida por IFN-gamma, tras la descongelación.

## Resultados

[0065] Los estudios de crecimiento se realizaron en medios libres de suero junto con suplementos de crecimiento de medios. En estos estudios, el rendimiento fue variable, y el éxito se definió como un medio que daba lugar a un fenotipo similar al del medio (AIMV) que contenía un 5% de suero humano. El medio libre de suero utilizado en los métodos descritos anteriormente dio lugar a un excelente crecimiento de células T y a un fenotipo similar al crecimiento en AIMV. Una observación inesperada fue que, para lograr un crecimiento y una viabilidad excelentes, era necesario pasar las células cuando la densidad celular alcanzaba aproximadamente  $1,5 \times 10^6$ /mL. Si las células no se pasaran aproximadamente a esta concentración celular, la viabilidad podría disminuir. Sin embargo, en el intervalo de aproximadamente 0,4 a  $1,5 \times 10^6$ /mL, las células crecieron bien con un tiempo de duplicación de 24 horas o menos en cultivo a 37 °C en matraces o en sistemas de bolsas cerradas.

[0066] El proceso para generar células T manipuladas en las que se introduce un nuevo gen receptor en células T utilizando un vector retroviral gamma requiere que las células estén en crecimiento activo para que puedan ser transducidas con éxito. En este caso, las células T se transdujeron con un CAR anti-CD19, pero el proceso aquí descrito puede utilizarse para cualquier CAR o TCR. Se demostró que el crecimiento de células T humanas puede estimularse en el medio OpTmizer™ utilizando anticuerpo anti-CD3 e IL2 tanto en matraces T abiertos como en un sistema cerrado de bolsas de cultivo celular. Se utilizó FACS para demostrar que las células teñidas con CFSE crecían igual de bien en medio OpTmizer™ o AIMV más 5% de suero humano durante esta estimulación. Aunque el crecimiento de células T se observó en otros tiempos de incubación, se demostró que una incubación de 2 días con anticuerpo anti-CD3 e IL2 es óptima para conseguir que las células crezcan activamente en el medio OpTmizer™.

[0067] Se evaluó una variedad de condiciones para observar la transducción en el medio OpTmizer™ en un sistema de bolsa cerrada. Un aspecto novedoso de esta invención es el orden específico de los pasos que se desarrollaron para lograr la transducción en un sistema de bolsa cerrada en medio OpTmizer™. El proceso descrito tiene la ventaja de que es sencillo desde el punto de vista operativo, pero proporciona una frecuencia de transducción similar a las condiciones utilizadas anteriormente. Se descubrió que los pasos que antes se incluían en los protocolos de transducción no eran necesarios (por ejemplo, el bloqueo de las superficies recubiertas con proteínas como la HSA). La frecuencia de transducción no se ve afectada por el lavado de las células después de retirarlas de la bolsa de cultivo celular recubierta con RetroNectin®.

[0068] El análisis fenotípico de las células a los 6 días o a los 10 días tras el inicio del proceso de estimulación reveló que en el medio OpTmizer™ las células son generalmente similares a las células cultivadas en medio AIMV en bolsas similares o en el sistema de placas de uso general (véanse las FIGS. 4-5). Del mismo modo, las células producidas en el sistema de bolsa de proceso simple y cerrado en medio OpTmizer™ son capaces de producir IFNgamma en respuesta a células diana Ag-positivas en un ensayo de co-cultivo *in vitro*, lo que demuestra que las células T fabricadas mediante este proceso mejorado son biológicamente activas.

[0069] La Tabla 1 a continuación muestra la producción de IFNgamma (pg/ml) en el día 6 usando el proceso mejorado aquí descrito.

Tabla 1

	Líneas celulares CD19+			Líneas celulares CD19-	
	Toledo	Nalm6	CD19-K562	NGFR-K562	CEM
NT anterior	0	5	17	17	5
NT mejorado	0	228	56	5	17
TD anterior	11269	13986	64911	43	17
TD mejorado	11101	16883	104324	70	0
Control	11942	19818	81165	30	5

Las muestras fueron de una corrida diseñada a gran escala

NT - no transducido; TD - transducido

[0070] Otra observación inesperada fue que la simple disminución de la duración del cultivo de 10 días o más a los 6 días actuales dio lugar a una distribución de células T más juvenil con una mayor representación de células de memoria central naive y una menor representación de células T efectoras diferenciadas (véanse las FIGS. 4-5). Esto tiene un efecto beneficioso sobre la potencia del producto y otros atributos. En concreto, se pueden recoger suficientes células del producto expandido tras sólo 3 días en cultivo. El tiempo total desde el inicio de la estimulación hasta la recolección de las células transducidas expandidas es de 6 días, lo que permite una dosis de aproximadamente  $1-2 \times 10^8$  células CAR positivas (FIG. 6). Si se necesita un mayor número de células, éstas siguen creciendo robustamente en bolsas y se puede cosechar un cultivo celular a los 10 días o más. Alternativamente, se puede utilizar un mayor número de células de la población inicial para generar una población celular mayor en el periodo de 6 días.

[0071] Además, se realizaron dos estudios a escala completa con aféresis de pacientes con linfoma en los que las células del Día 6 se lavaron posteriormente en solución salina al 0,9%, se formularon en la formulación del producto final y se criopreservaron. El producto celular del día 6 se evaluó antes y después de la descongelación en función de una serie de parámetros. No hubo diferencias significativas en el porcentaje de células T CAR-positivas 3 días después de la descongelación en relación con el nivel previo a la congelación, lo que sugiere que el protocolo de criopreservación no es perjudicial para la expresión de CAR. Además, las células CAR-positivas siguieron mostrando reconocimiento de antígeno CD19-específico, medido por la liberación de IFN-gamma tras el co-cultivo con dianas CD19-positivas. La viabilidad de las células en el momento de la descongelación fue del 90% y del 79%, respectivamente, para los dos productos probados.

### EJEMPLO 3: Desarrollo de las condiciones de transducción en un sistema cerrado

[0072] Anteriormente, la transducción de PBMC se llevó a cabo en placas de 6 pocillos tratadas sin cultivo de tejidos. Las placas se recubrieron con RetroNectin® a  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  durante la noche a  $2-8^\circ\text{C}$ , o durante 2 h a temperatura ambiente. Tras la incubación, se retiró RetroNectin® y las placas se bloquearon con HSA al 2,5% durante 30 min, seguido de un lavado con HBSS + 5 mM HEPES. En el proceso basado en placas, el vector retroviral se aplicó en el pocillo recubierto y se centrifugó, tras lo cual se eliminó aproximadamente el 75% del sobrenadante viral y se añadieron las células para la transducción por espinoculación.

[0073] Como se indica en el presente documento, se realizaron tres estudios para optimizar la concentración de RetroNectin® para la transducción de PBMC en bolsas de cultivo celular cerradas, y para determinar si el lavado con HSA y la eliminación del sobrenadante viral afectaban a la transducción. El primer experimento se llevó a cabo en bolsas Origen PermaLife™ PL07, donde la activación, transducción y expansión celular se realizaron en medio AIM<sup>®</sup> + 5% de suero humano. Se evaluó un intervalo de concentración de RetroNectin® de 2-40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en PBMC de tres donantes distintos. No hubo diferencias significativas entre la transducción en placas frente a la transducción en bolsas a una concentración de RetroNectin® de 10 y 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , o la transducción llevada a cabo sin bloqueo de HSA al nivel de confianza del 95%. Sin embargo, al mismo nivel de confianza, la reducción de la concentración de RetroNectin® a 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , o la eliminación del vector retroviral de la bolsa antes de la transducción, parecieron reducir moderadamente la eficacia de la transducción, como se muestra en la Tabla 2 a continuación.

**Tabla 2.** Impacto de la concentración de RetroNectin®, el bloqueo de HSA y la eliminación del vector retroviral en la transducción en bolsas de cultivo celular en comparación con la transducción en placas.

	% de CAR+ CD3+						
	No transducido	TD <sup>2</sup> en Placa	TD en Bolsa (2 µg/mL)	TD en Bolsa (10 µg/mL)	TD en Bolsa (40 µg/mL)	TD <sup>2</sup> en Bolsa, sin Bloqueo de HSA	TD <sup>2</sup> en la remoción del vector de bolsa
PT1 <sup>1</sup>	0.670%	82.12%	74.80%	81.63%	76.62%	77.26%	67.70%
PT2 <sup>1</sup>	0.19%	80.25%	73.24%	78.39%	79.63%	82.75%	59.55%
PT3 <sup>1</sup>	0.81%	82.78%	72.39%	79.10%	-	75.80%	65.36%
Media	0.57%	81.70%	73.47%	79.70%	77.35%	75.13%	63.62%
Estd. Desv	0.33%	1.31%	1.22%	1.71%	2.01%	8.89%	5.76%
<sup>1</sup> PT1, PT2 y PT3 se refieren a PBMCs de tres donadores separados.							
<sup>2</sup> TD se refiere a transducción							
<sup>3</sup> Las condiciones sin un bloqueo de HSA o con remoción del vector retroviral se realizaron a una concentración de RetroNectin® de 10 µg/mL.							

**[0074]** Un segundo estudio en medio AIM V® + 5% de suero humano en bolsas Origen PermaLife™ PL07 utilizando PBMC de dos donantes distintos confirmó los resultados del primer estudio y demostró que la máxima eficacia de transducción en bolsas se produce en el intervalo de 1-20 µg/mL de RetroNectin® (véase la FIG. 8). Además, una etapa de bloqueo de HSA no mejora el proceso ni aumenta la eficacia de la transducción (véase la FIG. 9). Además, el estudio demostró que el fenotipo celular transducido (CD45RA/CCR7) no se ve afectado por la eliminación de la etapa de bloqueo HSA.

**[0075]** En un tercer estudio, se estimularon PBMC de 2 donantes en OpTmizer™ + 2,5% de suplemento en bolsa Origen PermaLife™ PL70 o AIM V® + 5% de HSA durante 2 días. El día 2, se lavaron las células y se transdujeron con el vector retroviral en placas PL30 o de 6 pocillos. La concentración de células durante la transducción fue de  $0,5 \times 10^6$ /mL. El día 3, las células transducidas se transfirieron a matraces T175 (como control) o a bolsas PL30. Los días 6 y 7, se evaluó la potencia de las células en el ensayo de co-cultivo y mediante FACS la expresión y el fenotipo de CAR. La figura 10 muestra el impacto de la concentración de RetroNectin® en la frecuencia de transducción, donde RetroNectin® por encima de 5 µg/mL no tuvo ningún impacto en la frecuencia de transducción en las bolsas. La figura 11 muestra que la actividad de las células analizadas en estas condiciones fue similar cuando se evaluaron las medidas de activación celular (expresión de CD107a y producción de IFN-gamma) en respuesta al reconocimiento del antígeno CD19 en las células diana. En este caso, las células transducidas se incubaron con células Nalm6 CD19-positivas durante cuatro horas, a lo que siguió la tinción para la expresión de CD107a en la superficie celular y para la producción intracelular de IFN-gamma.

**[0076]** Por lo tanto, de acuerdo con los métodos proporcionados en el presente documento, se admite un proceso en el que las bolsas están: recubiertas con RetroNectin® a 10 µg/mL; la transducción se ejecuta en bolsas utilizando medio OpTmizer™ + suplemento del 2. La transducción en bolsas produjo productos de células T con un fenotipo similar al de la transducción en placas; y la eliminación del vector retroviral antes de añadir las células a la bolsa durante la transducción no aumentó la frecuencia de transducción general, y puede que la disminuyera ligeramente.

#### **EJEMPLO 4: Desarrollo de una etapa de criopreservación para células T anti-CD19 CAR+ fabricadas**

**[0077]** Se llevaron a cabo una serie de estudios de desarrollo para determinar las condiciones óptimas para la criopreservación de células T CAR anti-CD19 fabricadas. Se diseñaron estudios para establecer condiciones de alta viabilidad en el momento de la descongelación, una formulación de producto congelado, un protocolo de congelación optimizado y para determinar el impacto de la descongelación por congelación en el fenotipo y la potencia de las células.

Se emplearon las siguientes medidas analíticas para evaluar el rendimiento: recuento celular por exclusión de azul tripán antes y después de la descongelación, tinción de anexina por FACS después de la descongelación, tinción FACS para determinar las células T CAR+ y el fenotipo (CCR7, CD45RA), crecimiento en cultivo de las células criopreservadas después de la descongelación, y potencia por producción de IFN-gamma después del co-cultivo con células CD19+.

[0078] Se utilizaron PBMC transducidas con el vector retroviral para evaluar las medidas de rendimiento antes mencionadas. En los estudios de desarrollo, se utilizaron células criopreservadas en el intervalo de concentración de 3 - 12 x 10<sup>6</sup>/mL en un volumen final criopreservado de 20 mL. Se espera que la densidad celular de los productos clínicos reales se sitúe dentro de este intervalo, en función del peso corporal del sujeto y de la frecuencia de transducción de CAR. Los estudios se realizaron en bolsas OriGen CS50 o en bolsas AFC KryoSure® 20-F, sin que se observaran diferencias notables.

[0079] Las células transducidas se lavaron y se volvieron a suspender en una solución que contenía 0,9% de solución salina o una mezcla 1:1 de PLASMA-LYTE® A y D5 media solución salina normal (5% de dextrosa / 0,45% de NaCl), con o sin albúmina de suero humano (HSA). A continuación, las células se mezclaron en una proporción de 1:1 o 1:2 con CryoStor® CS10. En los distintos estudios, las células se criopreservaron en un congelador de velocidad controlada (CRF), se almacenaron en LN2 en fase vapor durante > 2 días, se descongelaron y se evaluaron para determinar su viabilidad, expresión de CAR, fenotipo y actividad. En algunos experimentos, las células se mezclaron 1:1 con 80% de suero AB humano + 20% de DMSO como control.

[0080] La recuperación celular en el momento de la descongelación aumentó cuando se incluyó una concentración final del 2,5% de HSA en el producto criopreservado (Tabla 3). Además, las células congeladas con HSA mantuvieron una viabilidad más alta, empezaron a crecer más rápidamente cuando se volvieron a poner en cultivo y recuperaron más rápidamente una viabilidad celular alta (Tabla 4).

**Tabla 3.** Recuperación celular inmediatamente después de la descongelación de células T anti CD19 CAR+ criopreservadas con diferentes diluciones de criopreservantes.

Formulación	Células totales congeladas (x 10 <sup>6</sup> )		Células totales recuperadas (x 10 <sup>6</sup> )		% de recuperación post-deshielo	
	Sin HSA	HSA	Sin HSA	HSA	Sin HSA	HSA
soló CS10	68	74	52	58	77%	78%
2:1 CS10:Diluyente	68	74	51	63	76%	85%
1:1 CS10:Diluyente	68	74	45	69	66%	93%
1:1 Suero*:Diluyente	68	74	46	67	67%	91%

Diluyente se refiere a una suspensión celular en una mezcla 1:1 de PLASMA-LYTE® A y solución salina normal a la mitad D5 (5% de dextrosa / 0.45% de NaCl)

\*Suero - 80% de suero de AB humana/20% de DMSO

**Tabla 4.** Recuperación y crecimiento celular tras la descongelación de células T anti CD19 CAR+ criopreservadas en varias diluciones de criopreservantes.

ID de muestra	HSA	Viabilidad				Conteo de células (x 10 <sup>6</sup> )			
		Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 0 <sup>1</sup>	Día 1	Día 2	Día 3
solo CS10	No	96%	81%	86%	90%	20	19	33	58
2:1 CS10:Diluyente	No	96%	81%	86%	89%	20	14	29	49
1:1 CS10:Diluyente	No	95%	83%	86%	91%	20	21	36	66
1:1 Suero <sup>2</sup> :Diluyente	No	93%	86%	92%	97%	20	10	32	64
solo CS10	Sí	95%	90%	92%	93%	20	26	44	82
2:1 CS10:Diluyente	Sí	97%	88%	93%	95%	20	23	41	82
1:1 CS10:Diluyente	Sí	96%	86%	91%	93%	20	20	37	68
1:1 Suero <sup>2</sup> :Diluyente	Sí	95%	87%	94%	96%	20	20	36	66

Diluyente se refiere a una suspensión celular en una mezcla 1:1 de PLASMA-LYTE® A y solución salina normal a la mitad D5 (5% de dextrosa / 0.45% de NaCl)

<sup>1</sup> Número total de células colocadas en el cultivo en el día 0

<sup>2</sup> Suero - 80% de suero de AB humana/20% de DMSO

**[0081]** Los estudios que compararon PLASMA-LYTE® A/D5 medio salino normal con salino al 0,9% mostraron que no había diferencias significativas en la recuperación a la descongelación, el rendimiento del crecimiento celular en cultivo después de la descongelación o el fenotipo (Tabla 5). Además, no se observó ninguna mejora en estos parámetros cuando las células se diluyeron 1:2 con CryoStor® CS10 vs. CryoStor® CS10. 1:1 con CryoStor® CS10. En la mayoría de los experimentos con un 5% de suero humano en los diluyentes de células T con una concentración final de HSA en el producto criopreservado del 2,5%, el rendimiento fue igual o superior al de las células congeladas en 1:1 con un 80% de suero AB humano/20% de DMSO. Por lo tanto, se tomó la decisión de seleccionar un producto final criopreservado en el que las células se lavan con solución salina normal al 0,9%, se añade HSA al 5% y, a continuación, las células se diluyen 1:1 con CryoStor® CS10.

**Tabla 5.** Rendimiento de las células diluidas en solución salina normal al 0,9% frente a medio salino normal PLASMA-LYTE®/D5.

Muestra	Viabilidad (%)				Cuento de células (células x 10 <sup>6</sup> )				
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	# de células recuperadas en deshielo <sup>1</sup>	# de células colocadas en el cultivo	Día 1	Día 2	Día 3
2:1 NS	91	86	91	85	163	20	21	22	29
2:1 NS	90	84	85	86	155	20	17	21	26
1:1 NS	91	81	88	85	175	20	15	22	42
1:1 NS	93	86	84	88	163	20	20	21	45
2:1 PL/D5	91	87	87	84	161	20	16	24	23
2:1 PL/D5	91	83	85	88	172	20	20	23	27
1:1 PL/D5	95	87	89	87	191	20	18	25	24
1:1 PL/D5	93	87	88	86	203	20	17	24	21

<sup>1</sup>200 x 10<sup>6</sup> de células se congelaron en cada bolsa en un volumen total de 20 mL.  
 PL/D5 – mezcla 1:1 de PLASMA-LYTE® A y solución salina normal a la mitad D5 (5% de dextrosa / 0,45% de NaCl); NS – Solución salina normal

**[0082]** El desarrollo del ciclo de congelación se llevó a cabo con la formulación seleccionada de 0,45% de solución salina normal, 2,5% de HSA y 50% de CryoStor® CS10, y un volumen de producto final de aproximadamente 50-60 mL en bolsas Origen™ CS250. Todas las series se realizaron individualmente, utilizando una única formulación y volumen de medio para cada serie. Se purgó el aire de la bolsa y se controló la temperatura del producto fijando un termopar a la superficie externa de la bolsa. Las bolsas individuales se colocaron en un casete de congelación diseñado para alojar la bolsa CS250, como Custom BioGenic Systems™, número de pieza ZC021, y se colocaron en el estante central de una rejilla de congelación en el congelador de velocidad controlada.

**[0083]** Se evaluó una serie de ciclos de congelación para determinar el punto en el que la solución salina normal al 0,45%, la HSA al 2,5% y el CryoStor® CS10 al 50% nucleaban espontáneamente para ayudar a decidir dónde iniciar el pico de temperatura. Después de cada ejecución, se introdujeron modificaciones en el protocolo de congelación hasta obtener un perfil de temperatura de la muestra satisfactorio. Los criterios para la creación de una muestra satisfactoria fueron que el pico de frío compensara el calor de fusión en el mayor grado posible y que la muestra se ajustara a una velocidad de enfriamiento de 1 °C/minuto. El protocolo optimizado para la bolsa de 50 mL en el Congelador de Ritmo Controlado (CRF) se muestra en la Tabla 6, y el perfil de temperatura correspondiente de la cámara y el producto se muestra en la Figura 12.

**Tabla 6.** Ciclo de congelación optimizado para la formulación del producto de células T anti CD19 CAR+ en el congelador de velocidad controlada.

<b>Paso</b>	<b>Acción</b>	<b>Temperatura de la cámara de destino</b>
1	Esperar a 4 °C	NA
2	Incrementar 1.0 °C/min	-23.0 °C
3	Incrementar 30.0 °C/min	-75.0 °C
4	Incrementar 10.0 °C/min	-28.0 °C
5	Incrementar 1.0 °C/min	-40.0 °C
6	Incrementar 10.0 °C/min	-90.0 °C

REIVINDICACIONES

1. Un método para fabricar células T  
5 que expresan un receptor de superficie celular que reconoce una fracción antigénica específica en la superficie de una célula diana, comprendiendo el método
- (a) enriquecimiento de una población de linfocitos obtenidos de un sujeto donante;  
10 (b) estimular la población de linfocitos con uno o más agentes estimulantes de células T para producir una población de células T activadas, donde la estimulación se realiza en un sistema cerrado utilizando un medio de cultivo libre de suero;  
(c) transducir la población de células T activadas con un vector viral que comprenda una molécula de ácido nucleico que codifique el receptor de superficie celular, utilizando una transducción de ciclo único para producir  
15 una población de células T transducidas, en la que la transducción se realice en un sistema de bolsa cerrada utilizando un medio de cultivo libre de suero, en el que la bolsa esté recubierta con una proteína de fibronectina humana recombinante o un fragmento de la misma; y  
(d) expandir la población de células T transducidas durante un tiempo predeterminado para producir una población de células T modificadas, en la que la expansión se realiza en un sistema cerrado utilizando un medio de cultivo sin suero.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, en el que el receptor de superficie celular es un receptor de células T (TCR) o un receptor de antígeno quimérico (CAR).
3. El método de la reivindicación 1, en el que la célula diana es una célula cancerosa.
- 25 4. El método de la reivindicación 3, en el que la célula cancerosa es una malignidad de célula B.
5. El método de la reivindicación 3, en el que el receptor de superficie celular es un CAR anti-CD19.
- 30 6. El método de la reivindicación 1, en el que uno o más agentes estimulantes de células T son un anticuerpo anti-CD3 e IL-2.
7. El método de la reivindicación 1, en el que el vector viral es un vector retroviral.
- 35 8. El método de la reivindicación 7, en el que el vector retroviral es un vector retroviral gamma MSGV1.
9. El método de la reivindicación 1, en el que el tiempo predeterminado para expandir la población de células T transducidas es de 3 días.
- 40 10. El método de la reivindicación 1, en el que el tiempo transcurrido desde el enriquecimiento de la población de linfocitos hasta la producción de las células T modificadas es de 6 días.
11. El método de la reivindicación 10, en el que las células T modificadas son para uso en el tratamiento de un paciente con cáncer, en el que el paciente con cáncer y el sujeto donante son preferiblemente el mismo individuo.
- 45 12. El método de la reivindicación 1, en el que el sistema cerrado es un sistema de bolsa cerrada.
13. El método de la reivindicación 1 o 12, en el que la bolsa no se bloquea con HSA durante la etapa de transducción.
- 50 14. El método de la reivindicación 1, en el que la población de células comprende células T naive, en el que preferentemente aproximadamente 35-43%, al menos aproximadamente 35%, o al menos aproximadamente 43% de la población de células T manipuladas comprende células T naive.

55

60

65

FIG. 1

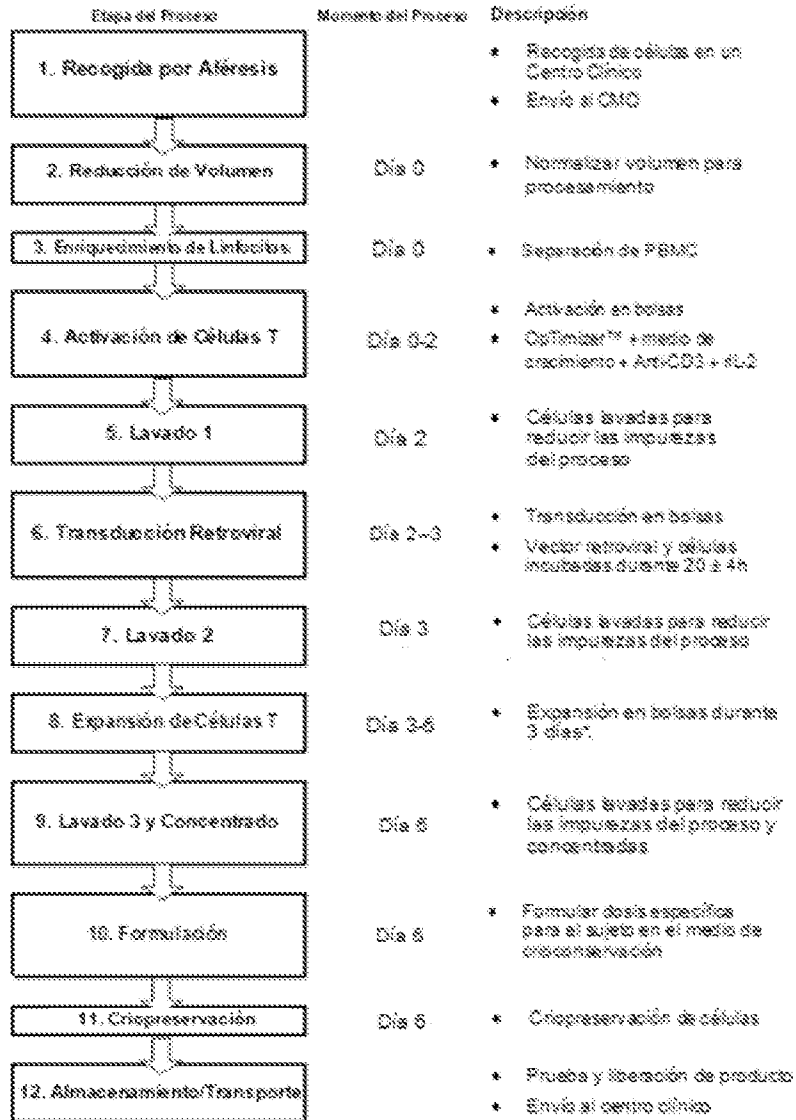


FIG. 2

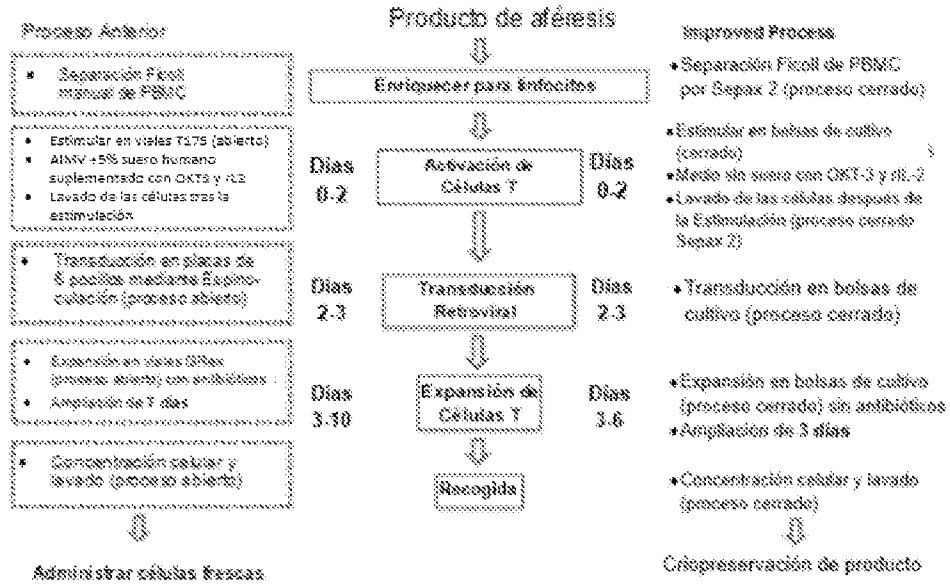


FIG. 3

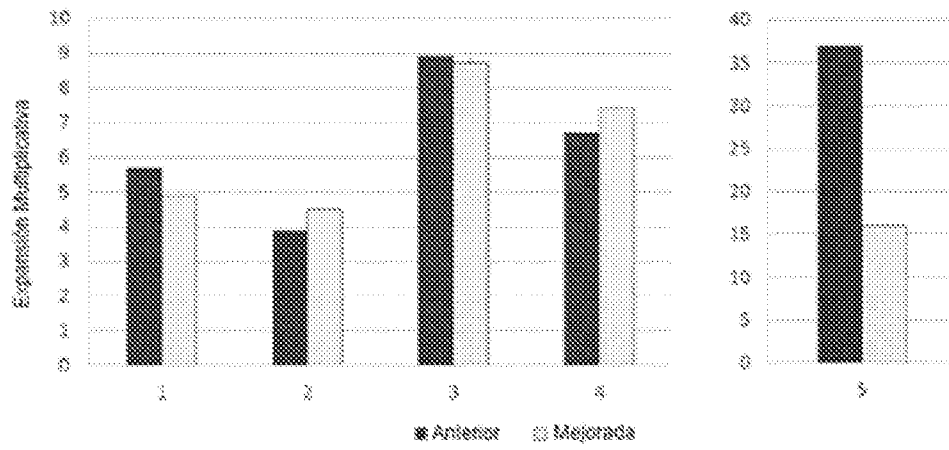


FIG. 4

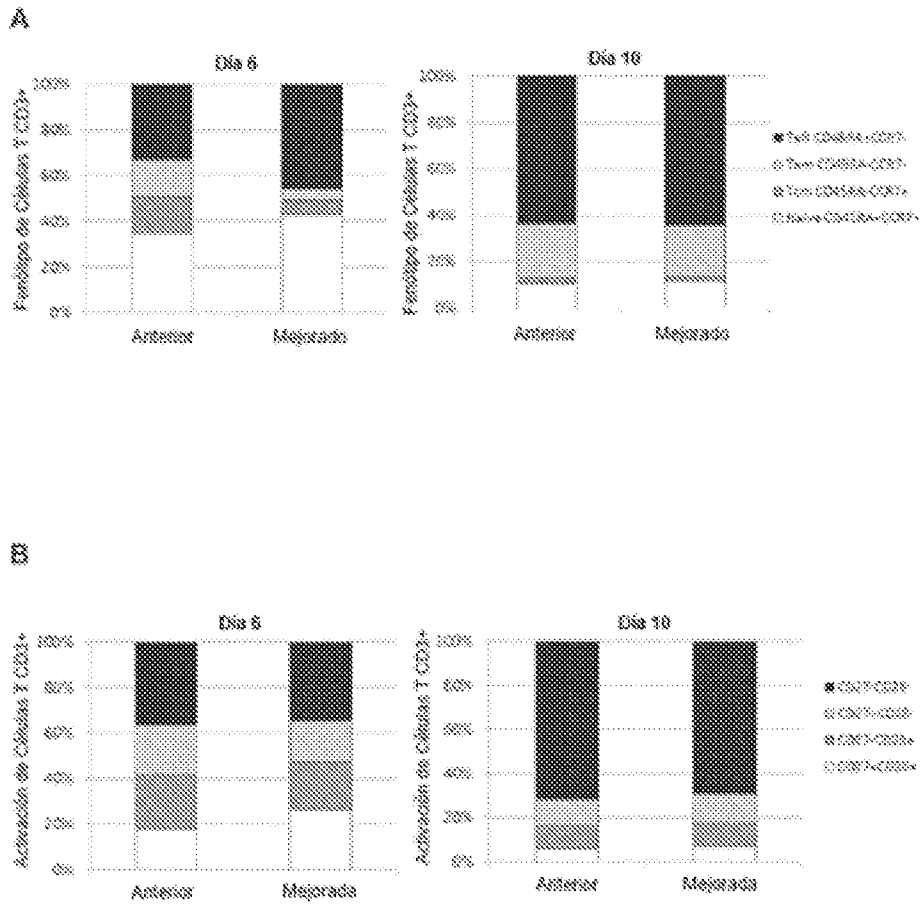


FIG. 5

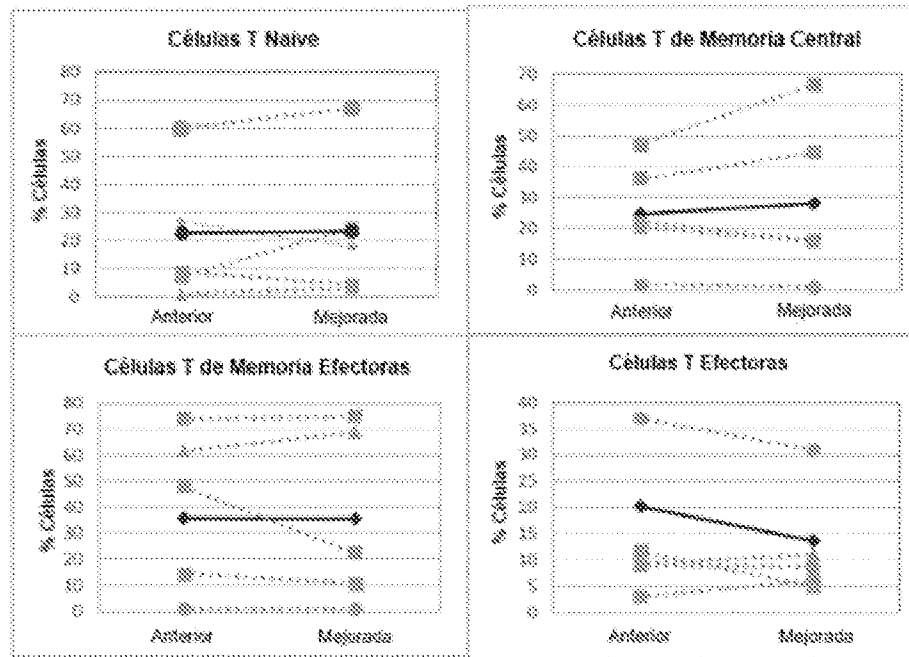


FIG. 6

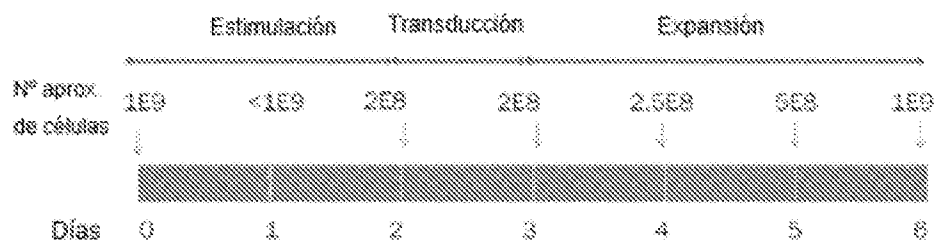






FIG. 8

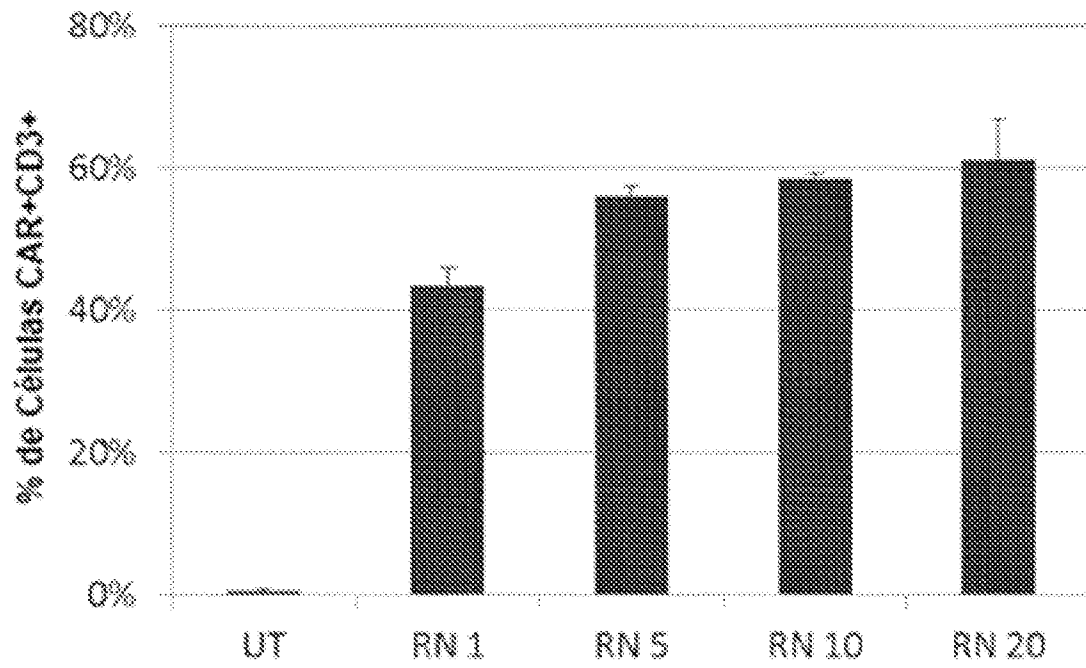


FIG. 9

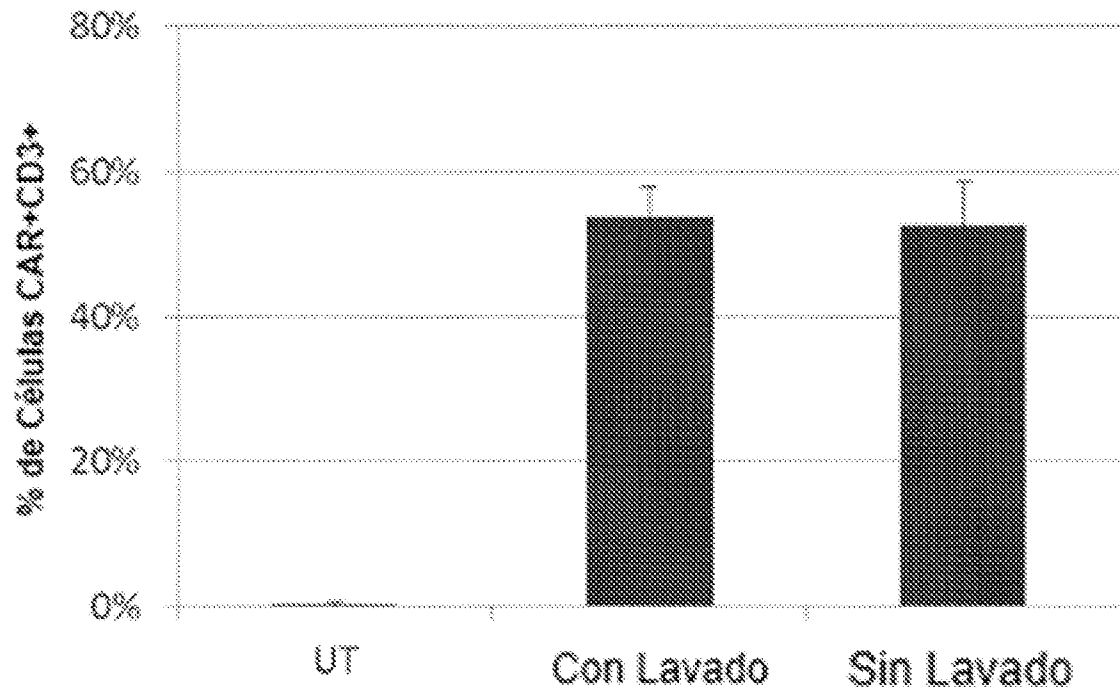


FIG. 10

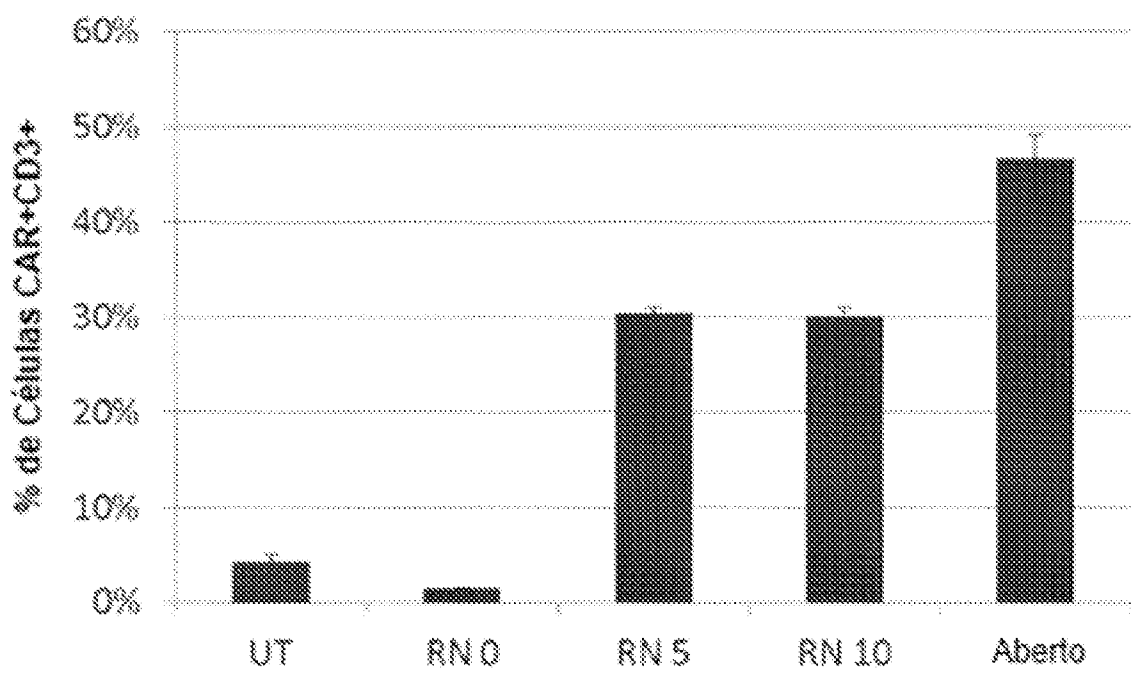


FIG. 11

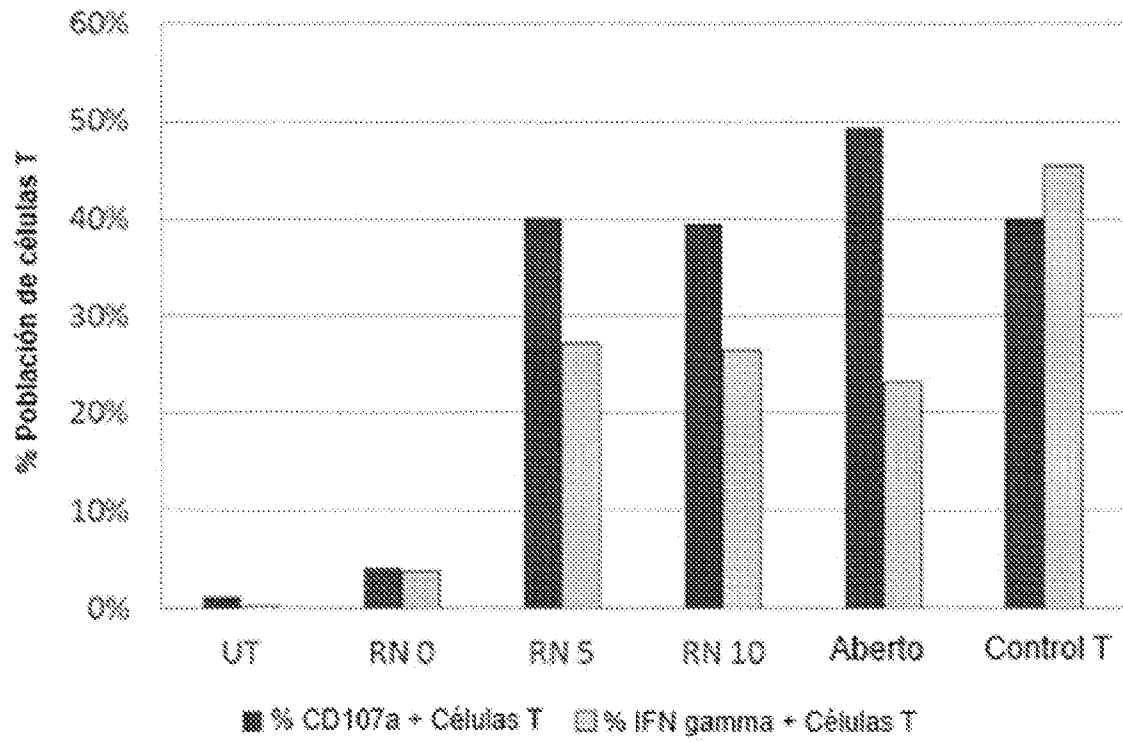


FIG. 12

