



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 337**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/867** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05741716 .4**

96 Fecha de presentación : **05.05.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1743029**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.01.2007**

54 Título: **Preparación de células.**

30 Prioridad: **06.05.2004 GB 0410130**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**19.10.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**19.10.2011**

73 Titular/es: **MOLMED S.p.A.**  
**Via Olgettina 58**  
**20132 Milán, IT**

72 Inventor/es: **Benati, Claudia;**  
**Sciarretta Birolo, Roberto;**  
**La Seta Catamancio, Simona;**  
**Radrizzani, Marina;**  
**Sendresen, Cecilia y**  
**Toma, Salvatore**

74 Agente: **Campello Estebaranz, Reyes**

ES 2 366 337 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

Preparación de células

**Objeto de la invención**

5 La presente invención se refiere a métodos para transducción y selección de células genéticamente modificadas en un sistema cerrado.

**Antecedentes de la invención**

10 En la actualidad se utiliza usualmente un sistema abierto para la transducción y selección de células genéticamente modificadas. Sin embargo, tales sistemas pueden consumir mucho tiempo y pueden estar asociados con riesgos de contaminación importantes. Éste es particularmente el caso cuando las células deben utilizarse en un escenario clínico y cuando se requieren dosis elevadas. Un ejemplo de un requisito de este tipo es la producción de células T donantes para uso en trasplante alogénico de médula ósea.

El trasplante alogénico de médula ósea es el tratamiento de elección para muchas enfermedades hematológicas malignas (Thomas 1983, J Clin Oncol 1:517; O'Reilly 1993, Curr Op In Hematol 221).

15 En el contexto del trasplante alogénico de médula ósea, el papel inmunológico de los linfocitos T donantes en la erradicación frecuentemente completa del tumor está reconocido universalmente. El efecto antitumoral derivado de los linfocitos T donantes (Injerto-versus-Leucemia, GvL) hace que este método terapéutico sea superior a la quimioterapia y el trasplante autólogo convencionales.

20 Además, la infusión de linfocitos T donantes es capaz también de mediar la reconstitución de respuestas inmunes contra virus y hongos, lo que se demuestra por la menor incidencia y gravedad de dichas infecciones en el contexto del trasplante no manipulado frente a aquéllos que se han empobrecido en linfocitos T (Papadopoulos 1994, N Engl J Med 330:1185; Rooney 1995, The Lancet 345:9; Heslop 1996, Nature Med 2:551; Rooney 1998, Blood 92: 1549; Riddell 1992, Science 257; Walter 1995, N Engl J Med 333:1038).

25 Frente a un beneficio clínico claro en la inducción de un efecto antitumoral, la infusión de linfocitos T donantes se ve todavía complicada por un riesgo elevado del desarrollo de la enfermedad del injerto frente al hospedador (GvHD). Esto es debido a la agresión contra los tejidos del hospedador por los linfocitos del donante y se caracteriza por muerte y morbilidad elevadas, especialmente en pacientes que reciben el trasplante de un donante emparentado haploidéntico (Kolb 1995, Blood 86:2041; Collins 1997, J Clin Oncol 15:433; Porter 2000, Blood 95:1214).

30 La incidencia y gravedad de la enfermedad es proporcional al número de linfocitos infundidos, lo que significa que cuanto mayor es la dosis tanto más grave es la enfermedad. Dado que el beneficio clínico en términos de actividad antitumoral y antiviral es proporcional a la dosis de infusión, el aumento de la dosis aumenta el beneficio antitumoral pero aumenta al mismo tiempo el riesgo de GvHD. No existe un tratamiento específico para la GvHD y las terapias en uso, basadas en esteroides y otros inmunosupresores, son inespecíficas y se ven complicadas por una incidencia elevada de infecciones graves y recaída de la enfermedad.

35 Con objeto de lograr una reconstitución inmunológica y reducir la incidencia de sucesos infecciosos y recaída de la enfermedad en tanto que se es capaz de controlar selectivamente la GvHD emergente, una estrategia prometedora es el uso de linfocitos donantes que han sido transducidos con un vector retroviral que contiene genes suicidas y marcadores. El gen suicida hace que las células genéticamente modificadas sean sensibles a un fármaco que se utilizará más tarde para eliminar selectivamente las células infundidas en caso de GvHD emergente. La presencia de un gen marcador permite el seguimiento de la supervivencia, expansión y sitios de migración de las células genéticamente modificadas.

40 Por ejemplo, puede utilizarse el vector SFCMM-3, que lleva a la vez el gen suicida HSV-tk y el gen marcador ALNGFR (Verzeletti 98, Human Gene Therapy 9:2243). HSV-tk codifica la enzima timidina-quinasa del Virus del Herpes Simplex I (HSV-tk) que, una vez insertado en los linfocitos donantes, hace que los mismos sean selectivamente sensibles a ganciclovir. El fármaco ganciclovir, después de administración al paciente, es fosforilado por la enzima timidina-quinasa expresada por las células genéticamente modificadas y luego sucesivamente por quinazas celulares. La forma activa de ganciclovir inhibe la síntesis de DNA genómico, causando de este modo la muerte celular (Smee 1983, Antimicrobials Agents and Chemotherapy 4:504). El sistema suicida HSV-tk ha demostrado ya ser eficiente en diversos estudios clínicos (Bordignon 1995, Hum Gene Ther 2:813; Bonini 1997, Science 276:1719; Tiberghien 1997, Hum Gene Ther 8:615; Tiberghien 2001, Blood 97:63; Link 1998, Hum Gene Ther 9:115; Champlin 1999, Blood 94:1448).

50 El gen LNGFR codifica el receptor de afinidad baja para el factor de crecimiento de los nervios (NGF) que ha sido delecionado en la porción intracelular de tal modo que ya no es capaz de transmitir señales (ALNGFR) (Mavilio 1994, Blood 83:1988). Utilizando anticuerpos monoclonales y cuentas magnéticas, la presencia de la proteína ALNGFR permite la inmunoselección in vitro de las células genéticamente modificadas. Además, la expresión de la

proteína ALNGFR se utiliza como marcador para las células genéticamente modificadas una vez infundidas al paciente para permitir la documentación de la presencia, expansión o reducción de dichas células y para su caracterización en términos de subtipos de linfocitos y estado de activación.

- 5 Los estudios clínicos arriba indicados (Bordignon 1995, Hum Gene Ther 2:813; Bonini 1997, Science 276:1719; Tiberghien 1997, Hum Gene Ther 8:615; Tiberghien 2001, Blood 97:63; Link 1998, Hum Gene Ther 9:115; Champlin 1999, Blood 94:1448) están basados en métodos diferentes para la producción de linfocitos modificados genéticamente (el producto final). Los métodos incluyen la descongelación, estimulación, transducción, selección y expansión de las células y la recuperación del producto final para infusión al paciente. La seguridad del producto final, testada antes de la infusión al paciente, está relacionada con la manipulación de las células durante cada paso del proceso. Usualmente, estos métodos se desarrollan en sistemas abiertos utilizando matraces para cultivo de las células y cabinas de flujo laminar para las manipulaciones de células tales como transducción y selección. Actualmente se utiliza un sistema abierto para producción de las células T transducidas para protocolos clínicos. Sin embargo, un sistema de este tipo puede consumir mucho tiempo y puede estar asociado con riesgos importantes de contaminación.
- 10
- 15 Por consiguiente, existe necesidad de un método eficiente y seguro de transducción y selección de las células genéticamente modificadas.

### Resumen de la invención

La presente invención resuelve el problema mencionado anteriormente por proporcionar un método para manipulación y cultivo de las células en un sistema cerrado. La transformación de un sistema abierto a un sistema cerrado permite la escalación del producto y la mejora de la seguridad del producto para uso clínico.

20

En un aspecto de la presente invención se proporciona un método para transducción de células con un constructo genético y selección de células genéticamente modificadas, comprendiendo el método realizar la transducción y selección en un sistema cerrado, en donde las células se lavan, concentran, transducen y resuspenden utilizando un dispositivo automático de tratamiento de fluidos sin transferencia manual alguna de los fluidos, y en donde el método comprende la selección inmunomagnética de las células transducidas.

25

En otro aspecto de la presente invención se proporciona un método de modificación de células, que comprende:

- (i) la descongelación opcional de dichas células;
- (ii) la estimulación opcional de dichas células;
- (iii) la transducción de dichas células con un constructo genético;
- 30 (iv) la selección de las células transducidas;
- (v) la expansión opcional y cosecha de dichas células transducidas;
- (vi) en donde los pasos (i) a (v) se realizan en un sistema cerrado, y en donde el paso (iv) comprende la selección inmunomagnética de las células transducidas; y
- 35 (vii) en donde las células se lavan, concentran, transducen y resuspenden utilizando un dispositivo automático de tratamiento de fluidos sin transferencia manual alguna de los fluidos, y en donde el método comprende la selección inmunomagnética de las células transducidas.

Un sistema cerrado es un sistema aislado que impide la exposición de las células al ambiente exterior del sistema. Las células se ven expuestas únicamente al ambiente inmediato de bolsas, tuberías y componentes de la máquina que constituyen el sistema cerrado.

- 40 El sistema cerrado de la presente invención previene la contaminación de las células transducidas. El sistema logra esto por garantizar que las células están totalmente aisladas respecto al ambiente externo al sistema, previniendo que entren contaminantes en el mismo.

En una realización, el constructo genético es un vector retroviral.

Preferiblemente, el vector retroviral es un vector derivado del virus de la leucemia Murina (mLV).

- 45 Preferiblemente, el vector retroviral codifica un marcador de la superficie celular, tal como, por ejemplo, LNGFR, que puede ser reconocido por un anticuerpo específico.

En una realización, las células son células T donantes.

- Preferiblemente, el método comprende un paso de transducción que utiliza fibronectina o una variante de la misma. Estudios anteriores han sugerido que algunos fragmentos quimotrópticos de molécula de la matriz extracelular pueden aumentar la transducción de las células progenitoras hematopoyéticas humanas cuando las mismas se
- 50

utilizan durante la infección (Moritz et al. (1994) J. Clin. Invest. 93, 1451; Moritz, et al (1996) Blood 88, 855). Takara ha desarrollado un péptido recombinante de fibronectina humana, CH-296 (RetroNectin®), que se compone de tres dominios funcionales (Hanenberg et al. (1996) Nature Medicine 2, 876) y se ha demostrado que mejoran la transducción de genes mediada por retrovirus (Kimizuka et al., (1991) J. Biochem. ~ 110, 284). Cuando se aplica en forma de capa sobre la superficie de cápsulas Petri o matraces o bolsas, RetroNectin® mejora significativamente la transducción de genes mediada por retrovirus en células de mamífero.

Preferiblemente, en la presente invención se utiliza el sistema de transducción RetroNectin®.

El método de la presente invención comprende selección inmunomagnética. La expresión selección inmunomagnética hace referencia al acoplamiento de anticuerpos a partículas paramagnéticas permitiendo una separación de las estructuras antigénicas por el uso de un imán. Por ejemplo, una subpoblación genéticamente modificada de células transducidas que expresan la molécula ΔLNGFR de la superficie celular puede incubarse con un anticuerpo receptor IgG de ratón anti-NGF que se fija a las células ΔLNGFR-positivas. Las células pueden incubarse luego con cuentas inmunomagnéticas recubiertas con IgG anti-ratón de oveja, y aplicarse a un imán a fin de aislar las células ΔLNGFR-positivas. Las células aisladas pueden recuperarse por desactivación del imán.

El sistema cerrado puede comprender un solo dispositivo que realiza todos los pasos necesarios para llegar a las células transducidas aisladas.

Alternativamente, el sistema cerrado puede comprender dos o más dispositivos. Un primer dispositivo puede utilizarse para los pasos de concentración de las células, lavado de las células, transducción y cambio de medio, y un segundo dispositivo puede realizar la selección de las células transducidas. La transferencia de células entre los dispositivos puede realizarse por el uso de bolsas selladas y conexiones asépticas a fin de garantizar que el proceso global sigue siendo un proceso cerrado. Preferiblemente, las células se lavan, concentran, transducen y resuspenden por utilización de un dispositivo automático de tratamiento de fluidos para la manipulación de las células. El dispositivo puede estar constituido por una membrana rotativa que asegura la filtración de las células contra una circulación de tampón en contracorriente, y que está conectada a diferentes bolsas, en un sistema totalmente cerrado que permite una programación paso a paso definible por el usuario. El lavado y la concentración de las células pueden realizarse en un conjunto estéril desechable constituido por la membrana rotativa conectada a una bolsa filtrada de lavado, una bolsa de tampón y una bolsa de desechos. El procedimiento de lavado deseado puede ser definido por el usuario. Un ejemplo de un dispositivo de este tipo es el Sistema de Procesamiento de Células Cytomate™.

El producto final del proceso anterior puede concentrarse en una bolsa. La bolsa puede conectarse luego asépticamente a un segundo conjunto de tuberías a fin de iniciar el paso de selección utilizando microesferas (cuentas) paramagnéticas. Un ejemplo de un dispositivo adecuado para este paso es el Sistema Magnético de Separación de Células Isolex™ 300.

El esquema de proceso que se muestra en la Figura 1 resume los pasos que pueden ser necesarios para la preparación de las células genéticamente modificadas de acuerdo con la presente invención.

Dependiendo del estudio clínico, pueden manipularse diferentes materiales biológicos de partida. Pueden suprimirse uno o más pasos. En una realización, pueden suprimirse los pasos en las áreas oscurecidas.

La invención se refiere a métodos para transducción y selección de células genéticamente modificadas, preferiblemente para uso clínico, en un sistema cerrado.

Particularmente, la invención puede incluir pasos sucesivos de descongelación (requeridos únicamente en el caso de que se utilicen células congeladas como material de partida), estimulación (si se requiere basada en características de células y vectores), transducción y selección (v.g., con utilización de vectores retrovirales), expansión y cosecha de células específicas del paciente para uso clínico. El proceso global puede conducirse en un periodo de tiempo corto, por ejemplo inferior a dos semanas.

Puede utilizarse un sistema cerrado para cada paso, con inclusión de lavado celular, cambio de medio, incubación para transducción y selección y cosecha final para infusión de las células en el paciente.

En una realización, la seguridad del producto final se garantiza por el sistema cerrado desarrollado utilizando materiales plásticos desechables y dispositivos capaces de realizar dos clases de operaciones diferentes: 1) concentración de las células/lavado/cambio de medio; 2) selección magnética.

En particular, la presente invención puede utilizarse con éxito para la clonación de células T genéticamente modificadas a utilizar en el contexto de protocolos clínicos de trasplante alogénico de médula ósea.

Por ejemplo, pueden utilizarse los dispositivos siguientes:

1) Sistema de Procesamiento de Células Cytomate™, marca comercial de Nexell Therapeutic Inc.) (Baxter, código R4R9860), para manipulación de células en kits desechables cerrados de grado clínico (Conjunto Desechable de Lavado de Células, Baxter, código R4R9811);

2) Sistema Magnético de Separación de Células Isolex™ 300, para selección de las células transducidas.

- 5 Ejemplos de Sistemas de Procesamiento de Células Cytomate™ utilizados para lavado de células después de descongelación y ejemplos de uso de selectores magnéticas de células para aislamiento en escala clínica de células) se dan en Calmels 2003, Bone Marrow Transplant 31:823 y Suen 2001, Cytotherapy 3:365, respectivamente.

10 La presente invención agrupa los diferentes pasos de descongelación, estimulación, transducción, selección, expansión de las células y recuperación del producto final para infusión al paciente en un solo método, utilizando un sistema totalmente cerrado que podría estandarizarse para una manipulación fácil de las células en los centros clínicos.

Ventajas de la presente invención incluyen la combinación de los diferentes pasos en un solo método, la mejora de la seguridad del producto final y la manipulación fácil de las células.

- 15 Características y realizaciones preferidas adicionales de la presente invención se describirán a continuación por medio de un ejemplo no limitante y con referencia a los dibujos que se adjuntan, en los cuales:

La Figura 1 muestra un esquema de proceso que resume los pasos que pueden ser necesarios para la preparación de células genéticamente modificadas.

20 La Figura 2 muestra el efecto de los métodos de estimulación y transducción sobre la expansión celular. La multiplicidad de expansión se evaluó sometiendo a recuento las células en cada momento puntual indicado y dividiendo por el número de células sembradas el día 0.

La Figura 3 muestra el efecto de los métodos de estimulación y transducción sobre la eficiencia de la transducción. El % de células LNGFR-positivas se evaluó el día 6 por citometría de flujo.

25 La Figura 4 muestra el efecto de la ratio cuentas/células sobre la expansión celular. La multiplicidad de expansión se evaluó sometiendo a recuento las células en cada momento puntual indicado y dividiendo el número de células viables por el número de células sembradas el día 0.

La Figura 5 muestra el efecto de la ratio cuentas/células sobre la eficiencia de la transducción. El % de células LNGFR-positivas se evaluó el día 6 por citometría de flujo.

### Ejemplo 1

- 30 Eliminación por lavado de DMS de los linfocitos donantes después de descongelación.

La presente invención proporciona un método para manipulación y cultivo de células en un sistema totalmente cerrado con el uso de un dispositivo para manipulación de las células en kits desechables cerrados de grado clínico.

35 En este ejemplo, se utilizó el CytoMate™ como dispositivo automático de tratamiento de fluidos para manipulación de las células. El mismo está constituido por una membrana rotativa que asegura la filtración de las células contra una circulación de tampón en contracorriente y está conectado a diferentes bolsas, en un sistema totalmente cerrado que permite una programación paso a paso definible por el usuario.

40 El lavado y la concentración de las células se realizan en un conjunto estéril desechable constituido por la membrana rotativa conectada a una bolsa de lavado filtrado, una bolsa de tampón y una bolsa de desechos. Este sistema permite el procesamiento celular en un ambiente GMP. El procedimiento de lavado es definido por el usuario, la bolsa que contiene la muestra (a procesar) está conectada al conjunto estéril y la transferencia de fluidos, entre las diferentes bolsas, definidas por el procedimiento, está monitorizada por cuatro balanzas y sondas.

Una interfaz simple dirigida por menú permite la programación de hasta 100 procedimientos personalizados.

La eficiencia de lavado se define ajustando el parámetro "multiplicidad de reducción de residuos" en el programa de lavado.

45 El material de partida para la producción de células genéticamente modificadas definido anteriormente puede estar constituido por células recientes o congeladas (precedentes de aféresis, plasma coagulable, sangre periférica entera, sangre del cordón umbilical, médula ósea), y cuando se utilizan células congeladas, las mismas se descongelan y el DMSO, un componente crioprotector (10%) del medio de congelación, se elimina por lavado después de descongelación a fin de estimular las células para el cultivo celular.

- Después de conexión de la bolsa (o bolsas) de muestra a la tubería de la fuente celular del conjunto desechable (Baxter, código R4R9811), las células se diluyen dos veces con tampón de descongelación frío (X-VIVO 15, más 1% de glutamina y 600 UI de IL-2) primeramente con 10 ml a un régimen de 5 ml/min y luego con 20 ml a un régimen de 10 ml/min. Durante estas operaciones, la bolsa (o bolsas) descongelada(s) se estratifica(n) sobre una capa de hielo o sobre un paquete de hielo y se agita(n) luego suavemente a fin de resuspender las células y evitar la sedimentación celular.
- A continuación, las células se lavan y se concentran con el uso de la membrana rotativa y se transfieren a una bolsa de recogida; la bolsa original, la bolsa de lavado y las tuberías se lavan con 130 ml de tampón a fin de minimizar la pérdida de células. Resumidamente, la suspensión de células pasa a través de la membrana rotativa donde las células se concentran fuera de la membrana y pasa a través de la abertura superior mientras que el sobrenadante que contiene los residuos celulares y DMSO pasa a través de la membrana saliendo por la abertura inferior.
- La eficiencia y duración del paso de lavado dependen del parámetro seleccionado, la "multiplicidad de reducción de residuos", que define el grado de lavado, el grado en que se elimina el fluido original durante el procedimiento de lavado. El valor de este parámetro puede seleccionarse de 1 a 1000. Se seleccionó el valor de 100 basándose en datos de Nexell, CytoMate™ Custom Programming Guidelines; este valor dará como resultado una reducción de 2-log de la solución fuente. El volumen final, usualmente entre 100 y 250 ml, depende de dos parámetros seleccionables: el número inicial de células y el peso máximo final de la bolsa de lavado, seleccionándose el valor de 250 como ajuste por defecto basándose en datos de Nexell, CytoMate™ Custom Programming Guidelines.
- Al final del procedimiento de lavado puede recogerse una muestra de células y evaluarse en cuanto a viabilidad celular y número de células; a continuación puede diluirse la suspensión de células, de acuerdo con el número de células, con el tampón de lavado que es el medio utilizado para cultivo de las células; las células se preparan para estimulación a una concentración de  $1 \times 10^6$ /ml en medio de cultivo.
- La duración del procedimiento de lavado, con inclusión de la dilución final de las células, es aproximadamente 1 hora.
- Se condujeron dos experimentos diferentes utilizando el procedimiento de lavado arriba descrito, con un solo paso de lavado. En estos experimentos, se evaluaron diferentes parámetros: volumen inicial y final, con objeto de evaluar la factibilidad del lavado de las muestras iniciales con un volumen pequeño de suspensión de células; número de células inicial y final, a fin de evaluar la pérdida de células durante los pasos de descongelación y lavado; la duración del procedimiento total, a fin de comprobar si el procedimiento consume menos tiempo comparado con un sistema abierto; y el volumen del tampón de lavado utilizado, a fin de evaluar el consumo de reactivos.
- En los experimentos descritos a continuación, el material de partida es una bolsa de PBL congelado procedente de plasma coagulado de donantes sanos.
- El volumen del material de partida es 15 ml, pero puede tratarse un amplio intervalo de volúmenes de células en una o más bolsas.
- El número de células en la bolsa es aproximadamente de  $1 \times 10^9$  en total, pero el intervalo del número de células a tratar puede estar comprendido entre  $0,1 \times 10^9$  y  $100 \times 10^9$  contenidas en una o más bolsas.
- El valor de reducción de 2-log (el valor de "multiplicidad de reducción de residuos" 100, ajustado por el usuario en el programa de lavado) de la solución fuente (que contiene DMSO y residuos celulares) se seleccionó de acuerdo con los datos de la bibliografía sobre eliminación por lavado de DMSO utilizando CytoMate™ (Calmels B. et al., Bone Marrow Transplant, 31 de mayo de 2003 (9):823-8), pero el valor 50 es ya suficiente para eliminar más del 96% del DMSO.
- La Tabla 1 muestra los resultados obtenidos en tres experimentos independientes utilizando células de plasma coagulado de donantes diferentes.

Tabla 1

	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
Volumen inicial	15 ml	15 ml	20 ml
Volumen final	80 ml	80 ml	87 ml
Número inicial de células viables	$0,885 \times 10^9$	$1 \times 10^{9*}$	$0,97 \times 10^9$
Número final de células viables	$0,880 \times 10^9$	$0,850 \times 10^9$	$0,883 \times 10^9$
Viabilidad inicial	89%	86%	-
Viabilidad final	91%	87%	100%
Recuperación de células	99%	85%	91%
Tiempo	1 h	1 h	1 h
Tampón de descongelación	400 ml	488 ml	350 ml
Volumen final para cultivo de células	880 ml	850 ml	883 ml

Viabilidad =  $n^\circ$  de células viables/ $n^\circ$  de células totales x 100; el test se realiza utilizando tinción con azul tripán

Recuperación =  $n^\circ$  de células finales/  $n^\circ$  de células iniciales x 100

5 \* = el número de células se evaluó el día de congelación de las células

Un método alternativo para reducción de la solución fuente podría ser ajustar un programa con un lavado secundario. Cada programa puede ser definido paso a paso por el usuario.

10 El procedimiento sigue los mismos principios arriba descritos pero con la adición de un paso de lavado secundario. En este caso, la duración del procedimiento se prolonga a 1 hora y 20 minutos y el volumen de tampón de descongelación aumenta hasta 1100 ml.

Se realizaron tres experimentos utilizando un procedimiento con la adición de un lavado secundario.

15 En estos experimentos, se evaluaron los mismos parámetros arriba descritos: volumen inicial (el volumen de la suspensión de células en la bolsa de muestra) y volumen final a fin de evaluar la factibilidad de lavado de la muestra inicial con un volumen pequeño de suspensión de células; el número de células inicial y final a fin de evaluar la pérdida de células durante los pasos de descongelación y lavado; la duración del procedimiento total a fin de comprobar si el procedimiento consume menos tiempo en comparación con un sistema abierto; el volumen de tampón de lavado utilizado a fin de evaluar el consumo de reactivos.

20 En los experimentos descritos a continuación, el material inicial es una bolsa de PBL congelado procedente de plasma coagulado de donantes sanos en el experimento 4 y una bolsa de PBL congelado procedente de aféresis de donantes sanos en el experimento 5, pero el procedimiento puede aplicarse por ejemplo a muestras de sangre del cordón umbilical o de médula ósea.

El volumen del material de partida es 20-100 ml, pero el intervalo de volúmenes celulares a tratar puede estar comprendido entre 1 ml y 9.999 ml contenidos en una o más bolsas.

25 El número de células en la bolsa es aproximadamente  $1 \times 10^9$ , pero el intervalo de número de células a tratar puede estar comprendido entre  $0,1 \times 10^9$  y  $100 \times 10^9$  contenidas en una o más bolsas.

La Tabla 2 muestra los resultados obtenidos en dos experimentos independientes utilizando células de plasma coagulado o aféresis de donantes diferentes.

Tabla 2

	Experimento 4	Experimento 5
Volúmenes iniciales	20 ml	100 ml*
Volumen final	233 ml	295
Número inicial de células viables	$1 \times 10^{9+}$	$1.2 \times 10^{9+}$

Número final de células viables	0,932x10 <sup>9</sup>	1x10 <sup>9</sup>
Viabilidad de las células finales	88%	100%
Recuperación de células	93%	83%
Tiempo	1 h 20'	1 h 20'
Tampón de descongelación	1100 ml	1100 ml
Volumen final para cultivo de células	932 ml	1000 ml
<p>Viabilidad = <math>n^{\circ}</math> de células viables/<math>n^{\circ}</math> de células totales x 100, el test se realiza utilizando tinción con azul tripán                      Recuperación = <math>n^{\circ}</math> de células finales/ <math>n^{\circ}</math> de células iniciales x 100                      * = en este experimento, la muestra inicial se descongeló anteriormente y se diluyó en una bolsa hasta 100 ml de tampón de descongelación.                      + = el número de células se evaluó el día de descongelación de las células</p>		

**Discusión**

5 El volumen inicial de las muestras en 4 de 5 experimentos se encuentra en un intervalo comprendido entre 15 y 20 ml; únicamente en un experimento el volumen inicial se diluyó con tampón de descongelación hasta un volumen total de 100 ml.

- Los resultados de estos experimentos demuestran que no existe un impacto importante del • volumen inicial sobre la recuperación de las células y la viabilidad después de la descongelación.

10 La recuperación media de las células en los cuatro primeros experimentos es en realidad 92%, con una desviación estándar de 5,7% (intervalo: 85-100%) y el valor de 83% en el quinto experimento está próximo a este intervalo.

La viabilidad celular media es 91,5%, con una desviación estándar de 5,9% (intervalo: 87-100%) y el valor de 100% en el quinto experimento está dentro del intervalo.

Los experimentos indican que el paso de descongelación puede realizarse comenzando por una pequeña cantidad de 15-20 ml y volúmenes mayores de la muestra inicial.

- 15 • Con respecto a la pérdida de células, los experimentos 1 y 3, que se realizaron testando el número inicial de células después de descongelación y antes del lavado de las células con el CytoMate™, muestran una pérdida de células máxima de 9%.

- 20 • En los experimentos 2, 4 y 5, el número de células antes de la congelación se consideró como el número de células inicial. Esto representa probablemente una sobreestimación del número inicial real. Incluso en tal caso, se observó una pérdida de células máxima de 15%.

Estos valores de pérdida de células no son significativamente diferentes de nuestros datos actuales obtenidos con un sistema abierto (datos no presentados) y de los datos que se muestran en la bibliografía utilizando el CytoMate™ (Calmels B. et al., Bone Marrow Transplant, 31 de mayo de 2003 (9):823-8).

- 25 • La duración del procedimiento total (los pasos incluidos son: descongelación de la muestra inicial, lavado de la muestra y dilución de la muestra para cultivo de las células) es 1 hora considerando un solo ciclo de lavado con el dispositivo, de acuerdo con los datos de la bibliografía (Calmels B. et al., Bone Marrow Transplant, 31 de mayo de 2003 (9):823-8), con una demora de 20 minutos considerando un lavado secundario de las células.

30 Estos datos no son tampoco significativamente diferentes de nuestros datos actuales obtenidos con un sistema abierto, que es aproximadamente de 1 hora.

De acuerdo con estos resultados, el proceso de descongelación y lavado realizado en un sistema cerrado comparado con el proceso realizado en un sistema abierto no consume mucho tiempo y la seguridad de las células procesadas está perfectamente preservada con el sistema cerrado dado que las células se transfieren, durante las

operaciones de descongelación y lavado, desde la bolsa inicial a la bolsa final de cultivo a través de un conjunto de tuberías, el medio de cultivo se añade a través de una bolsa y las muestras para el testado de las células se extraen con una jeringuilla estéril. Las conexiones entre las diferentes bolsas se hacen con un soldador estéril de tuberías (Sterile Connecting Device, Terumo) que asegura conexiones asépticas o con el uso de espigas para inserción en las aberturas de las bolsas.

El sistema evita el contacto de la muestra y de los reactivos de proceso con el ambiente.

## Ejemplo 2

*Efecto de diferentes estimulaciones de linfocitos sobre el crecimiento celular, en bolsas o en matraces*

Con objeto de evaluar el crecimiento celular en un sistema cerrado, se realizaron varios experimentos de estimación de linfocitos, de diferentes maneras: con OKT® 3 (Orthoclone, Janssen-Cilag S.p.A.) y con Dynabeads® CD3/CD28 T cell Expander (DynaL Biotech, código nº 111.31) ambos en presencia de IL-2 recombinante. Pueden considerarse otras estimulaciones, por ejemplo con anticuerpos solubles CD3/CD28 o con diferentes cócteles de citoquinas.

OKT® 3 es una solución estéril, para uso clínico, de anticuerpo monoclonal murino contra el antígeno CD3. OKT® 3 se utiliza actualmente en estudios clínicos de terapia génica a fin de inducir la proliferación de linfocitos para transducción de células con vectores retrovirales. Los vectores retrovirales precisan de hecho proliferación celular a fin de autointegrarse en el genoma celular durante la duplicación del DNA.

Dynabeads® CD3/CD28 T cell Expander son cuentas superparamagnéticas de poliestireno recubiertas con una mixtura de anticuerpos CD3 y CD28. El anticuerpo CD3 es específico para el antígeno humano CD3 en las células T, al igual que OKT® 3, y el anticuerpo CD28 es específico para el antígeno humano CD28 co-estimulador en las células T.

Las Dynabeads® mimetizan el comportamiento in vivo de las células presentadoras de antígeno con una estimulación simultánea de células T con dos señales, induciendo así la expansión de las células T.

En los experimentos que siguen, resumidos en las Figuras 2 y 3, se utilizaron PBL de 9 donantes, en 6 experimentos independientes, con objeto de evaluar el efecto de la estimulación con OKT® 3 frente a la estimulación con cuentas sobre el crecimiento celular. La expansión de las células se determinó utilizando un cultivo de 10 días en sistema abierto (muestra de espinoculación de OKT 3) y en bolsas (otras muestras); cada momento puntual representa el valor medio de 6-8 datos.

Se evaluó también el efecto de las diferentes estimulaciones sobre la eficiencia de transducción (% de células LNGFR-positivas después de la transducción).

En la muestra de espinoculación de OKT 3, la transducción se realizó utilizando un método de espinoculación (en un sistema abierto, y en las otras muestras la transducción se realizó utilizando RetroNectin, en un sistema cerrado).

Estos métodos de transducción y el vector retroviral utilizado para todos los experimentos descritos más adelante se explican detalladamente en los Ejemplos 3 y 4. El vector contiene un gen marcador de la superficie celular que codifica una forma truncada de receptor NGF humano de afinidad baja que permite la evaluación de la eficiencia de transducción testando la expresión de  $\Delta$ -LNGFR en la superficie celular con un análisis por citofluorometría.

La Figura 2 muestra únicamente los resultados de la proliferación preliminar de las células: todas las muestras se comparan hasta el día 6, pero únicamente se comparan hasta el día 10 cuentas CD3 frente a 3:1.

En este último paso son más evidentes las diferencias de proliferación entre las diversas muestras.

La Figura 3 hace referencia a la Figura 2, testándose las mismas muestras respecto a eficiencia de transducción, comparando el sistema abierto con el sistema cerrado.

Los resultados, resumidos de varios experimentos en la Figura 2, demuestran que las células estimuladas con OKT 3 en un sistema abierto tienen una potencialidad de proliferación mayor que las células estimuladas en un sistema cerrado. Sin embargo, la estimulación obtenida con el uso de cuentas CD3/CD28 aumenta el crecimiento celular en el sistema cerrado. Estas diferencias en la proliferación celular son más eficientes entre los días 6 y 10 del cultivo de células, mientras que hasta el día 6, dos o tres días después del paso de transducción, la proliferación celular es muy similar en todas las muestras.

Se evaluó en los mismos experimentos la eficiencia de transducción después de la transducción de linfocitos estimulados con el método diferente, Figura 3. Los resultados eran muy interesantes, demostrando que la estimulación con CD3/CD28 y la transducción con RetroNectin en el sistema cerrado dan como resultado una mayor eficiencia de transducción (% de células LNGFR-positivas) que la otra estimulación realizada con OKT3, sea con el método de transducción con espinoculación o con el método de RetroNectin.

Esto es muy importante para la eficiencia del sistema cerrado comparado con el sistema abierto, dado que a pesar de la menor proliferación, el número final de células genéticamente modificadas es mayor en el sistema cerrado, debido a la mayor eficiencia de transducción obtenida.

5 Estos resultados preliminares se confirmaron con otros experimentos, un ejemplo representativo de los cuales se muestra en las Figuras 3 y 4.

La Figura 4 muestra un experimento representativo de proliferación celular que pone de manifiesto las diferencias en un sistema cerrado entre las muestras estimuladas con OKT3 y con dos ratios cuentas/células diferentes.

La Figura 5 muestra en su lugar, en el mismo experimento, la eficiencia de transducción obtenida con RetroNectin y espinoculación, comparando los datos obtenidos con las estimulaciones con OKT3 y cuentas.

10 Los resultados confirman los datos preliminares obtenidos con los experimentos resumidos en la Figura 3, en los cuales la eficiencia de transducción era mayor utilizando RetroNectin que utilizando espinoculación.

15 La Figura 4 confirma que la estimulación con CD3/CD28 aumenta la proliferación celular en un sistema cerrado comparada con la estimulación por OKT3; y que la ratio cuentas/células es muy importante para el crecimiento celular, dado que parecen ser precisas al menos dos cuentas por cada célula. Probablemente, la ratio 3:1 tal como ha sido sugerido por Dynal Biotech podría aumentar aún más la tasa de proliferación.

Por el contrario (Figura 5) esta ratio cuentas/células no afecta a la eficiencia de transducción. Tanto para la ratio 2:1 como para la ratio 1:1, el porcentaje de células LNGFR-positivas después de la transducción es mayor que el porcentaje obtenido por la estimulación con OKT3, confirmado que la eficiencia de transducción después del paso de transducción, obtenida en un sistema cerrado utilizando RetroNectin es mayor con estimulación por CD3/CD28.

20 Estos datos sugieren que la producción de células genéticamente modificadas en un sistema cerrado es muy importante a fin de garantizar la seguridad del producto y que el mismo podría ser también un sistema muy eficiente.

### Ejemplo 3

#### ***Vectores para transducción de células***

25 Todos los experimentos que conducen a la producción de células genéticamente modificadas para terapia génica se realizaron utilizando un vector retroviral.

30 Esta invención puede utilizarse para células transducidas por vectores retrovirales, donde todos los pasos de producción consistentes en descongelación, lavado, transducción, selección, expansión y recuperación final pueden realizarse en un sistema totalmente cerrado, pero es aplicable a otros protocolos, en los cuales se utilicen algunos de estos pasos o el orden de los pasos tenga que cambiarse o invertirse, o se utilicen diferentes vectores, como vectores de lentivirus o adenovirus.

El vector retroviral seleccionado para los experimentos que siguen es SFCMM-3 (Verzeletti et al. HSV-TK gene transfer for controlled GvHD and GvL: clinical follow-up and improved new vectors. Human Gene Therapy, 1998).

La transcripción del gen  $\Delta$ LNGFR está regulada por el promotor temprano SV40.

35 Este vector puede utilizarse para producir linfocitos modificados por ingeniería genética con el gen suicida HSV-tk para estudios clínicos en el contexto del trasplante alogénico de médula ósea como se ha explicado anteriormente.

Están disponibles gran cantidad de datos acerca del proceso de producción de los linfocitos modificados por ingeniería genética en un sistema abierto. Este antecedente se utilizó para comparar el sistema abierto con el nuevo sistema cerrado de la presente invención.

40 ***Transformación del método de transducción cambiando el proceso de producción de un sistema abierto a un sistema cerrado.***

El paso de transducción con vectores retrovirales en un sistema abierto se realiza en estudios clínicos y asimismo en nuestro método de sistema abierto, de producción de células genéticamente modificadas, utilizando el protocolo de espinoculación.

45 En este método, las células, por ejemplo linfocitos, se recuperan después de dos o tres días de estimulación usualmente con OKT3 en cabinas de flujo laminar por los matraces de cultivo.

El medio de cultivo se elimina por lavado con un ciclo de centrifugación en tuberías y las células se suspenden en el medio sobrenadante retroviral con una concentración comprendida entre 1 y  $5 \times 10^6$  células/ml de sobrenadante retroviral, dependiendo del título de virus.

Las células se extienden en placas en recipientes de plástico para cultivo de células y se centrifugan a 1000-1200 g durante 1-2 horas. A continuación, se elimina el sobrenadante retroviral por lavado con centrifugación de las células en tuberías.

5 El sedimento de células se suspende en medio de cultivo y las células tratadas se extienden en matraces y se cultivan. Usualmente se realiza un segundo ciclo de transducción después de 24 horas de cultivo.

Después de 48 horas, las células se testan respecto a la expresión de  $\Delta$ LNGFR con análisis por citofluorometría.

En la presente invención de producción de células genéticamente modificadas en un sistema cerrado, el paso de transducción se cambió a fin de realizar el lavado de las células y la transducción en bolsas.

10 El método, explicado detalladamente en el Ejemplo 4, utiliza la molécula RetroNectin® (Takara), un fragmento de fibronectina humana recombinante, a fin de aumentar la transducción de genes mediada por retrovirus por co-localización de células diana y viriones. El cultivo de las células con el sobrenadante retroviral en bolsas recubiertas con RetroNectin® durante 12-24 horas permite la transducción de las células en un sistema cerrado.

Este método de transducción se comparó con el método de espinoculación después de estimulación de los linfocitos con OKT3 en varios experimentos, resumidos ya en el Ejemplo 2, Figura 3.

15 En la tabla siguiente, Tabla 3, se resumen las características de los dos métodos de transducción diferentes.

Tabla 3: Se utilizaron PBL de 9 donantes, en 6 experimentos independientes

	Método de transducción	Ciclos de Transducción	Tiempo de incubación	% de células transducidas, valor medio	Desviación estándar
Sistema abierto	Espinoculación	2	2h/ciclo	26,5	2,88
Sistema cerrado	RetroNectin®	1	12-24 horas	29	7,6

20 Las ventajas de la utilización del método de transducción con RetroNectin son: el paso a un sistema cerrado, más seguro, la reducción de los ciclos de transducción de 2 a 1, la eliminación del paso potencialmente peligroso de centrifugación y el aumento en la eficiencia de transducción.

Las consideraciones de seguridad y los resultados de eficiencia mejorada condujeron a los inventores a utilizar el método de transducción con RetroNectin® en el desarrollo del proceso de producción en sistema cerrado.

#### Ejemplo 4

##### *Transducción de linfocitos*

25 El segundo paso después de la estimulación celular es la transducción de las células.

30 En los experimentos que siguen, la transducción de linfocitos se realizó después de un paso de estimulación con OKT3 (Orthoclone) (pero pueden aplicarse diferentes protocolos de estimulación como se ha descrito en el párrafo anterior), cultivando las células durante 24 horas con sobrenadante retroviral (el vector es SFCMM-3, descrito anteriormente, que contiene el gen de interés y un gen para un marcador de la superficie celular) en bolsas pre-recubiertas con RetroNectin® (Takara). RetroNectin® es un fragmento de fibronectina humana recombinante que mejora la transducción de genes mediada por retrovirus por co-localización de las células diana y los viriones.

La transducción se realiza generalmente en un intervalo entre 0 y 7 días después de la estimulación. En los experimentos descritos a continuación, la transducción se realizó el día 2.

35 El proceso de transducción utilizando RetroNectin® implica diferentes pasos: preparación de bolsas recubiertas con RetroNectin®, preparación de las células diana, carga del vector retroviral en las bolsas pre-recubiertas con RetroNectin®, e incubación de las células en las bolsas pre-cargadas.

40 El polvo liofilizado de RetroNectin® se disuelve en agua estéril para inyección, se dispensa un volumen apropiado de esta solución en cada bolsa (bolsas CellGenix Vuelife o bolsas Baxter X-Fold) y se incuba a la temperatura ambiente (RT) durante 2 horas, protegido contra la luz. La concentración de RetroNectin® utilizada está comprendida generalmente en un intervalo entre 1 y 8  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de superficie de la bolsa. En estos experimentos se utilizaron 1,2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

Después de separar el RetroNectin®, se añade una solución estéril de Sero-Albúmina Humana con (HSA) al 2% en PBS a cada bolsa para bloqueo. Se requiere una incubación de 30 minutos a la temperatura ambiente, y a

continuación se elimina la solución de HSA por 3 lavados con PBS: las bolsas pueden utilizarse inmediatamente, preservarse a 4°C o a -80°C durante hasta una semana.

El sobrenadante retroviral se precarga luego en el RetroNectin® contenido en las bolsas durante 1 hora de incubación a 37°C.

- 5 El volumen de sobrenadante retroviral a utilizar para la transducción de las células guarda relación con el número de células, y la ratio entre el número de células y el volumen de sobrenadante puede estar comprendida entre  $0,5 \times 10^6$  células/ml y  $10 \times 10^6$  células/ml.

- 10 El sobrenadante se complementa con IL-2 (intervalo: 100-600 UI/ml), glutamina 2 mM y 3% de plasma autólogo. En estos experimentos, se utiliza la ratio de  $1 \times 10^6$  células/ml de sobrenadante retroviral. En lo que respecta al paso de pre-carga, el intervalo de sobrenadante a utilizar está comprendido entre 0 y el volumen total planificado. En estos experimentos, el sobrenadante utilizado para el paso de pre-carga era la mitad del planificado.

Inmediatamente antes de la infección, se recogen las células y se suspenden luego en el volumen de sobrenadante restante, añadiéndose los reactivos que se han descrito arriba. Como se ha mencionado anteriormente, se utilizó la ratio final de  $1 \times 10^6$  células/ml de sobrenadante retroviral.

- 15 La incubación de las células en las bolsas se realizó durante 24 h, pero puede estar comprendida por ejemplo en el intervalo de 1 h a 72 h.

Entre la transducción y la expresión génica, existe usualmente un retardo de 24-48 h; de hecho, en este paso la proteína ALNGFR ya no es detectable.

- 20 Los datos que se muestran en la Tabla 3 resumen los resultados de la eficiencia de transducción testada 48 horas después del proceso de transducción.

#### **Transducción utilizando CytoMate™**

Como se describe en detalle en el Ejemplo 1, un aspecto de la presente invención proporciona un método para manipulación y cultivo de las células en un sistema totalmente cerrado con el uso de un dispositivo para manipulación de las células en kits desechables cerrados de grado clínico.

- 25 En este ejemplo se utilizó CytoMate™ como un dispositivo automático de tratamiento de fluidos a fin de recoger las células inmediatamente antes de la infección.

De acuerdo con el protocolo arriba descrito, antes de la transducción, se recubren anteriormente una o más bolsas con RetroNectin® y se precargan con la mitad del volumen del sobrenadante retroviral planificado.

- 30 El día 2 después de la estimulación con OKT3, la bolsa (o bolsas) de linfocitos cultivados se recoge(n) utilizando CytoMate y se suspende(n) con la mitad del volumen del sobrenadante planificado en la bolsa (o bolsas) precargada(s) final(es). Se utilizó la ratio final de  $1 \times 10^6$  células/ml de sobrenadante retroviral.

La incubación de las células en las bolsas se realizó durante 24 h.

- 35 El lavado y la concentración de las células se realizan como para la descongelación de las células en un conjunto estéril desechable constituido por la membrana rotativa conectada a una bolsa de lavado filtrado, una bolsa de tampón y una bolsa de desechos. La bolsa de muestra con los linfocitos cultivados y la bolsa final con el sobrenadante precargado se conectan asépticamente al conjunto. Este sistema permite el procesamiento de las células en un ambiente GMP.

El procedimiento de lavado es definido por el usuario y es diferente en los distintos pasos del proceso de producción de las células genéticamente modificadas.

- 40 Resumidamente, las células se lavan con dos ciclos utilizando tampón frío (X-VIVO 15, con adición de 1% de glutamina y 600 UI/ml de IL-2) con el uso de la membrana rotativa y se transfieren a una bolsa de recogida, la bolsa de lavado. Las células se transfieren luego a la bolsa final en un pequeño volumen de aproximadamente 40 ml, la bolsa de lavado y las tuberías se enjuagan con la mitad del sobrenadante planificado a fin de reducir la pérdida de células. Este sobrenadante se transfiere a la bolsa final y las células se diluyen hasta  $1 \times 10^6$  células/ml de sobrenadante.

El sobrenadante retroviral en la bolsa final se diluye con los 40 ml, lo que depende de los diferentes parámetros definidos y del tampón de lavado, pero esta dilución no disminuye la eficiencia de transducción del sobrenadante retroviral (datos no presentados).

- 50 La eficiencia y duración del paso de lavado dependen del parámetro seleccionado "multiplicidad de reducción de residuos". Se seleccionó el valor de 50 basándose en los datos de Nexell (CytoMate™ Custom Programming Guidelines). El valor de 100 dará como resultado aproximadamente una reducción de 2-log de la solución fuente.

Al final del procedimiento de lavado puede evaluarse una muestra de células respecto al número de células viables, y las células se incuban finalmente durante 24 h en una incubadora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. El sobrenadante es un reactivo en el cual las partículas infectivas retrovirales se resuspenden en X-VIVO 15, el medio de cultivo celular. Como se ha descrito arriba, se añade el sobrenadante antes de la transducción con 1% de glutamina, 600 UI/ml de IL-2, 3% de plasma autólogo y protamina. Este ambiente de cultivo permite cultivar las células durante las 24 horas de incubación con la partícula retroviral.

La duración del procedimiento de lavado con inclusión de la dilución es del orden de 1 hora.

Se condujeron 3 experimentos diferentes utilizando el procedimiento de lavado arriba descrito. En estos experimentos, se evaluaron diferentes pasos: volumen inicial (el volumen de la suspensión de células en la bolsa de muestra) y volumen final; número inicial de células a fin de evaluar el volumen de sobrenadante a utilizar ( $1 \times 10^6$  células/ml de sobrenadante), número final de células a fin de evaluar la relación final "células frente a sobrenadante"; la duración del procedimiento total a fin de comprobar si el procedimiento consume menos tiempo comparado con un sistema abierto; y el volumen del tampón de lavado utilizado a fin de evaluar el consumo de reactivos.

La Tabla 4 resume los datos de los tres experimentos de lavado realizados utilizando CytoMate™.

15 **Tabla 4**

	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
Volumen inicial de la muestra	736 ml	847 ml	997 ml
Número inicial de células	$0,118 \times 10^9$	$0,186 \times 10^9$	$0,498 \times 10^9$
Sobrenadante planificado	118 ml	186 ml	498 ml
Volumen final de la muestra	158 ml	226 ml	556 ml
Concentración celular de la suspensión de células final	$0,75 \times 10^6$ /ml	$0,9 \times 10^6$ /ml	$0,9 \times 10^6$ /ml
Consumo de tiempo	40 min	40 min	1 h 41 min
Volumen de tampón de lavado	750 ml	500 ml	1000 ml

El volumen inicial de las muestras depende del número de células el día de estimulación cuando las células se cultivan a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml. El número de células depende de la estimulación, utilizando OKT3, disminuyendo usualmente el número dentro de dos días después de la estimulación. Una vez conocido el número de células, el volumen de sobrenadante a utilizar puede definirse utilizando la ratio  $1 \times 10^6$  células/ml de sobrenadante. El volumen final de la suspensión celular es el resultado del volumen de la suspensión después del lavado (aproximadamente 40 ml de tampón de lavado, X-VIVO 15) más el volumen de sobrenadante añadido. A este respecto, el sobrenadante final se diluye hasta un máximo de 0,33. Esta dilución no disminuye la eficiencia de transducción del sobrenadante. Las células se concentran durante el paso de transducción en un intervalo comprendido entre  $0,75-0,9 \times 10^6$  células/ml, y esta concentración permite una transferencia génica satisfactoria en las células como se describe en el párrafo siguiente.

El procedimiento con CytoMate™ es muy breve. Sólo en el experimento 3 el mismo tuvo una duración superior a 1 hora. El uso de este protocolo de RetroNectin en un sistema cerrado permite que el ciclo de transducción se reduzca a 1, mientras que en un sistema abierto con espinoculación hay dos ciclos con una duración de 2 horas.

De acuerdo con estos datos, el proceso de lavado realizado en un sistema cerrado a fin de preparar la suspensión celular para la transducción es rápido y la seguridad de las células procesadas está perfectamente preservada. Esto es debido a que las células se transfieren, durante las operaciones de lavado, desde la bolsa inicial a la bolsa final precargada con RetroNectin a través de un conjunto de tuberías, el sobrenadante se añade a través de una bolsa y las muestras para test de las células se manipulan con una jeringuilla estéril (recuento celular). Así pues, el sistema evita el contacto de la muestra y los reactivos de proceso con el ambiente. Esto está en contraste con el ciclo de

transducción que utiliza espinoculación en el cual las células se manipulan en matraces en una cabina de flujo laminar en la clase A.

### Ejemplo 5

#### **Cultivo de linfocitos después de la transducción**

5 Después de 24 horas de incubación con el sobrenadante retroviral, las células se cosecharon y se suspendieron en medio de cultivo en una (o más) bolsas para cultivo de células. El medio de cultivo es el mismo utilizado para la estimulación: X-VIVO 15 complementado con 3% de plasma autólogo, 1% de glutamina y IL-2 (intervalo: 100-600 UI/ml).

10 En este ejemplo se utilizó el CytoMate™ como dispositivo automático de tratamiento de fluidos a fin de manipular las células en un sistema cerrado. En este paso, las células se lavan utilizando X-VIVO 15 y se suspenden en medio de cultivo, después de lo cual se desecha el sobrenadante retroviral.

15 Una fracción de las células cultivadas se modifican ahora genéticamente, utilizando el vector retroviral descrito en el Ejemplo 3, que contiene el gen de interés y un gen marcador, una forma truncada del receptor NGF ( $\Delta$ LNGFR). Después de varios días de cultivo, en este protocolo dos días, se testa la población de células respecto a la expresión de  $\Delta$ LNGFR. El gen codificante de  $\Delta$ LNGFR no se expresa endógenamente en los leucocitos, sino únicamente en las células transducidas, y es detectable en la superficie de las células por análisis FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) con un anticuerpo anti-LNGFR acoplado con fluorocromo.

20 Resumidamente, las células conjugadas con fluorocromo pasan a través de un haz de rayos láser. Las mismas descomponen y dispersan la luz láser, que se detecta como luz dispersada hacia delante y luz dispersada lateralmente. El primer parámetro guarda relación con el tamaño celular, mientras que el segundo es un indicador de la complejidad interna de la célula. Además de la dispersión, el citómetro mide parámetros de fluorescencia. Los fluorocromos absorben la luz láser y emiten una porción de esta luz absorbida en diferentes regiones del espectro. El citómetro mide la cantidad relativa de cada tinte en las células individuales, procesa la señal electrónica resultante de cada célula y crea valores numéricos para cada parámetro. La información pasa luego al sistema de la computadora para presentación y análisis. La intensidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de anticuerpo conjugado con el fluorocromo fijada a la superficie celular.

#### **Eliminación por lavado del sobrenadante retroviral utilizando CytoMate™**

30 En este paso, el lavado y la concentración de las células se realizan como se describe en el Ejemplo 4 en un conjunto estéril desechable constituido por la membrana rotativa conectada a una bolsa de lavado filtrado, una bolsa de tampón y una bolsa de desechos. La bolsa de muestra con los linfocitos transducidos y la bolsa final para cultivo de las células están conectadas asépticamente al conjunto. Como se ha mencionado anteriormente, este sistema permite el procesamiento de las células en un ambiente GMP.

35 El procedimiento de lavado se define por el usuario y es el mismo que se ha descrito en el Ejemplo 4. Las células se lavan con dos ciclos utilizando tampón (X-VIVO 15, más 1% de glutamina e IL-2, intervalo: 100-600 UI/ml) con el uso de la membrana rotativa, y se transfieren a una bolsa de recogida, la bolsa de lavado, transfiriéndose luego las células a la bolsa final en un volumen programado, y enjuagándose la bolsa de lavado y las tuberías con un volumen fijado del tampón a fin de minimizar la pérdida de células.

40 La suspensión de células en la bolsa final se diluye luego de acuerdo con el número final de células a fin de cultivar las células con una concentración de  $0,2-0,5 \times 10^6$  células/ml de medio de cultivo. Se añadió plasma autólogo en una proporción de 3% del volumen total.

La eficiencia y duración del paso de lavado dependen del parámetro "multiplicidad de reducción de residuos" seleccionado. Se eligió un valor de 50 basándose en los datos de Nexell, CytoMate™ Custom Programming Guidelines. Un valor de 100 dará como resultado aproximadamente una reducción de 2-log de la solución fuente.

La duración del procedimiento de lavado con inclusión de la dilución final es aproximadamente 1 hora.

45 Se condujeron 3 experimentos independientes utilizando el procedimiento de lavado arriba descrito. En estos experimentos se consideraron los parámetros siguientes; volumen inicial, número inicial de células, duración del procedimiento total y volumen del tampón de lavado utilizado a fin de evaluar el consumo de reactivos. En un experimento, se evaluó el número final de células a fin de testar la pérdida de células durante el paso de lavado.

La Tabla 5 resume los datos de los tres experimentos de lavado realizados utilizando CytoMate™.

50

#### **Tabla 5**

	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
Volumen inicial de la muestra	158 ml	225 ml	556 ml
Número inicial de células	$0,24 \times 10^9$	$0,225 \times 10^9$	$0,445 \times 10^9$
Número final de células	-	$0,225 \times 10^9$	-
Consumo de tiempo	40 min	40 min	37 min
Volumen de tampón de lavado	750 ml	800 ml	1500 ml

El volumen inicial de las muestras depende del número de células el día de la transducción cuando las células se cultivan en proporción de  $1 \times 10^6$  células/ml en sobrenadante retroviral. A partir del número inicial de células, puede definirse el volumen del medio de cultivo a utilizar utilizando la ratio de  $0,5 \times 10^6$  células/ml de medio de cultivo.

5 El procedimiento con CytoMate™ es muy breve, como se describe también en el Ejemplo 4.

Utilizando un sistema abierto, las células deben centrifugarse a fin de desechar el sobrenadante y tienen que diluirse en una cabina de flujo laminar con medio de cultivo en matraces para cultivo de células. Este paso causa un estrés físico a las células y dificultades operativas, debido a que el volumen a manipular podría ser muy alto. Por ejemplo, en el experimento 3, tienen que separarse 556 ml de sobrenadante retroviral y es preciso distribuir 1100 ml de medio de cultivo en muchos matraces. Estas operaciones aumentan el riesgo de contaminación del producto.

10 El tiempo utilizado en un sistema abierto para estas operaciones es aproximadamente 1 hora y 30 minutos de acuerdo con datos de los autores de la invención.

De acuerdo con estos datos, el proceso de lavado realizado en un sistema cerrado con objeto de preparar la suspensión celular para cultivo de células consume menos tiempo comparado con el proceso de lavado realizado en un sistema abierto; la seguridad de las células procesadas está perfectamente preservada con el sistema cerrado dado que las células se transfieren, durante las operaciones de lavado, desde la bolsa inicial a la bolsa de cultivo final a través de un conjunto de tuberías, añadiéndose el medio de cultivo a través de una bolsa y manipulándose las muestras para test de las células con una jeringuilla estéril (recuento de células).

20 Este sistema evita el contacto de la muestra y de los reactivos de proceso con el ambiente y elimina el estrés de centrifugación que puede afectar a la viabilidad de las células.

### Ejemplo 6

Como se describe en el ejemplo anterior, durante dos días de cultivo después del paso de transducción, la subpoblación genéticamente modificada expresa la molécula  $\Delta$ LNGFR de la superficie celular. Esta molécula permite la selección de la subpoblación genéticamente modificada utilizando un sistema de cuentas magnéticas.

25 La suspensión de células se incuba con un anticuerpo receptor IgG de ratón anti-NGF de grado GMP que se fija a las células  $\Delta$ LNGFR-positivas, la subpoblación genéticamente modificada. Después de dos pasos de lavado, se realiza una segunda incubación con cuentas inmunomagnéticas de grado GMP recubiertas con IgG anti-ratón de oveja (Baxter, código RAR 9950).

30 La suspensión de células tratada con las cuentas se aplica luego a un imán con objeto de aislar las células  $\Delta$ LNGFR-positivas, recubiertas con las cuentas. La población negativa, que no es capturada por el imán, se elimina por lavado con el tampón adecuado (PBS con 0,1% de HSA).

35 Las células positivas se recuperan luego en medio de cultivo desactivando el imán. Después de 24 h de cultivo, se rompe la unión entre antígeno y anticuerpo. Las cuentas se liberan en el medio y se retiran con el uso del imán. Durante la aplicación del imán, las cuentas se fijan al imán y la población de células, que no es capturada por el imán se separa por lavado con el tampón adecuado (PBS con 0,1% de HSA).

La población de células recuperada, una población homogénea genéticamente modificada, se cultiva durante varios días, dentro de un periodo de 1 a 7 días, y se testa respecto a proliferación celular y expresión de  $\Delta$ LNGFR después de 48 horas como mínimo.

40 Como se describe para el paso de transducción, después de regulación decreciente de la molécula  $\Delta$ LNGFR, el gen codificante de la molécula  $\Delta$ LNGFR requiere 24-48 horas para la expresión de la molécula en la superficie celular.

El ensayo de citofluorometría utilizado para testar la expresión de  $\Delta$ LNGFR se ha descrito en el ejemplo anterior.

### ***Incubación del anticuerpo y lavado de las células utilizando CytoMate™***

La presente descripción utiliza CytoMate™ para realizar los pasos siguientes en un sistema cerrado: eliminación por lavado del medio de cultivo y concentración de las células, incubación de la suspensión de células con el anticuerpo receptor anti-NGF, eliminación por lavado del anticuerpo en exceso y concentración de las células para incubación con las cuentas.

- 5 El lavado y la concentración se realizan como se describe en el Ejemplo 4 en un conjunto estéril desechable constituido por la membrana rotativa conectada a una bolsa de lavado filtrado. Una bolsa de tampón y una bolsa de desechos se conectan también al conjunto. El tampón utilizado para el paso de incubación es HSA al 0,5% en PBS, y el utilizado para los pasos de lavado es HSA al 0,1% en PBS.

- 10 La bolsa de muestra con las células transducidas suspendidas en medio de cultivo y la bolsa final para recuperación de las células se conectan asépticamente al conjunto. Las células se testan respecto a número de células antes del lavado a fin de planificar las operaciones de selección.

Como se ha expuesto anteriormente, este sistema permite el procesamiento de células en un ambiente GMP. Las células se concentran en la bolsa de lavado con un solo ciclo programado de lavado con el uso de la membrana rotativa, utilizándose el tampón descrito anteriormente para separación por lavado del medio de cultivo.

- 15 Se añadió a la bolsa de lavado La solución de anticuerpo con los microgramos de anticuerpo planificados,  $1 \mu\text{g}/5 \times 10^6$  células. El paso "Circulación de la Bolsa de Lavado" planificado anteriormente después del paso de lavado, hace circular la suspensión de células en la bolsa de lavado a lo largo del circuito de lavado. Esta operación mezcla la suspensión de células con la solución de anticuerpo durante 20 minutos de acuerdo con el programa ajustado por el usuario.
- 20 Después del tiempo de incubación, el anticuerpo en exceso no fijado se separa por lavado con un segundo ciclo de lavado y las células se transfieren luego a la bolsa final en un volumen programado, y la bolsa de lavado y las tuberías se enjuagan con un volumen fijado del tampón a fin de reducir la pérdida de células.

La suspensión de células fijadas al anticuerpo, recogida en una bolsa, está lista ahora para ser incubada con las cuentas utilizando un dispositivo diferente equipado con un imán.

- 25 La eficiencia y duración de los pasos de lavado dependen del parámetro "multiplicidad de reducción de residuos" seleccionado. Se eligió el valor de 50 basándose en los datos de Nexell. El valor de 100 dará como resultado una reducción aproximada de 2-log de la solución fuente.

La duración del procedimiento total de lavado de las células e incubación de las células con el anticuerpo es del orden de 1 hora y 30 minutos.

- 30 Se condujeron 3 experimentos diferentes utilizando el procedimiento que acaba de describirse. En estos experimentos, se consideraron los parámetros siguientes; volumen inicial (el volumen de la suspensión de células en la bolsa de muestra), volumen final de la suspensión de células a fin de concentrar la célula para el paso de incubación subsiguiente, número inicial de células a fin de planificar los reactivos durante el procedimiento se selección, duración del procedimiento total a fin de comprobar si el procedimiento consume menos tiempo comparado con un sistema abierto, y volumen del tampón de lavado utilizado a fin de evaluar el consumo de reactivos. En un experimento, se testaron el número final de células y la viabilidad a fin de evaluar la pérdida de células durante el procedimiento.

La Tabla 6 resume los datos de los tres experimentos realizados utilizando CytoMate™.

**Tabla 6**

	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
Volumen inicial	1060 ml	450 ml	984 ml
Volumen final	25 ml	60 ml	76 ml
Número inicial de células	$2120 \times 10^9$	$0,810 \times 10^9$	$1,13 \times 10^9$
Número final de células	$1872 \times 10^9$	-	-
Tiempo	1 h 45 min	1 h 15 min	1 h 30 min
Volumen de tampón de lavado	1400 ml	1000 ml	1000 ml

40

El volumen inicial de las muestras depende del número de células después del paso de transducción (véase el Ejemplo 5), cuando las células se cultivan a razón de  $0,5 \times 10^6$  /ml en el medio de cultivo.

El volumen final de la suspensión de células tiene que detectarse a fin de concentrar las células para el paso subsiguiente de incubación con las cuentas.

- 5 Con el número inicial de células, pueden definirse el volumen de tampón de incubación (para preparar la solución de anticuerpo,  $20 \times 10^6$  células/ml de tampón) y los microgramos de anticuerpo a utilizar ( $1 \mu\text{g}/5 \times 10^6$  células).

El número final de células y la viabilidad de la suspensión de células se testaron en un experimento a fin de evaluar la pérdida de células durante el procedimiento. La viabilidad es 100%, demostrando que el procedimiento no estresa las células.

- 10 La recuperación de las células era 88% en el experimento 1, indicando que existe una pequeña pérdida de células después del procedimiento con CytoMate™ que podría reducirse modificando el programa, por ejemplo acortando el paso de lavado.

El procedimiento con CytoMate™ no consume mucho tiempo, siendo éste aproximadamente 1 hora y 30 minutos. En este periodo de tiempo se realizan muchas operaciones: dos lavados e incubación de 20 min. El tiempo utilizado en un sistema abierto para estas operaciones es aproximadamente 2 horas de acuerdo con la experiencia de los inventores.

- 20 De acuerdo con estos datos, el proceso de lavado, concentración e incubación realizado en un sistema cerrado a fin de fijar la suspensión de células con el anticuerpo y preparar las células para la selección magnética, comparado con el mismo proceso realizado en un sistema abierto consume menos tiempo y la seguridad de las células procesadas está perfectamente preservada con el sistema cerrado, debido a que las células se manipulan utilizando un conjunto de tuberías, los reactivos se añaden a través de una bolsa y las muestras para testado de las células se manipulan con una jeringuilla estéril (recuento celular).

Este sistema evita el contacto de la muestra y de los reactivos del proceso con el ambiente y elimina el estrés de centrifugación que puede afectar a la vitalidad de las células.

## 25 **Selección inmunomagnética**

El producto final del proceso anterior, las células sensibilizadas (incubadas con el receptor anti-NGF), está concentrado ahora en una bolsa. La bolsa puede conectarse asépticamente a un segundo conjunto de tuberías a fin de iniciar el paso de selección utilizando microesferas (cuentas) paramagnéticas y un dispositivo equipado con un imán (un separador magnético de células). El conjunto estéril, desechable y no pirogénico está compuesto de una cámara cilíndrica de 150 ml ventilada. La cámara está conectada permanentemente por el fondo a través de un colector en Y con dos sistemas de tuberías: la línea de entrada y la línea de salida. Ambas líneas tienen dos conexiones de espiga para fijación de bolsas que contienen la suspensión celular (la bolsa de muestra) y tampón de trabajo a la cámara a través de la línea de entrada y para fijación de las bolsas finales de recogida de las células y las bolsas de desechos a la cámara a través de la línea de salida.

- 35 En los experimentos descritos a continuación, el separador magnético utilizado es Isolex™ 300 diseñado por Baxter International Inc. que se utiliza para seleccionar y aislar células CD34+ a partir de una población heterogénea de células utilizando un anticuerpo monoclonal anti-CD34 y microesferas paramagnéticas.

- 40 En el protocolo estándar Isolex™ 300, las células se sensibilizan con el anticuerpo monoclonal anti-CD34 en un sistema abierto, las células se mezclan luego con las cuentas utilizando un conjunto de tuberías, se aíslan magnéticamente las células CD34+ y las células negativas no fijadas se eliminan por lavado. Finalmente, las células CD34+ se separan de las cuentas utilizando una molécula peptídica con afinidad alta para el anticuerpo primario. El complejo anticuerpo/péptido puede retenerse magnéticamente dentro de la cámara de separación mientras que las células CD34+ se retiran en una bolsa de recogida.

- 45 Este proceso fue seguido para los propósitos de la presente invención únicamente para mezclado de las células sensibilizadas (incubadas con el receptor anti-NGF) con las cuentas (Baxter, como se describe en detalle anteriormente) y para aislamiento magnético de las células  $\Delta\text{LNGFR}$ -positivas agrupadas en rosetas. Las células negativas no agrupadas en rosetas se separan por lavado de la cámara de separación a una bolsa de desechos con 3 ciclos de lavado.

- 50 Resumidamente, las dos bolsas de la línea de entrada y las dos bolsas de la línea de salida se conectan asépticamente con un soldador de tuberías estéril (Terumo) que asegura conexiones asépticas o con el uso de las espigas de las líneas a insertar en las aberturas de las bolsas. Este sistema evita el contacto de la muestra y los reactivos de proceso con el ambiente. Después de las conexiones, se inicia el programa de ajuste fijado con esta secuencia de pasos: cebado del conjunto de tuberías con el tampón de lavado, mezclado de las células sensibilizadas en la cámara con las cuentas, añadidas antes de la incubación a la bolsa de células inicial, separación magnética de las rosetas, y eliminación por lavado de las cuentas residuales y las células negativas.

55

El tampón de lavado es HSA al 0,1% en PBS. Las cuentas se añaden de acuerdo con el número inicial de células NGF-positivas en una ratio de 5 cuentas para 1 célula NGF-positiva. El número de células NGF-positivas se detecta antes de la selección en una pequeña cantidad de suspensión celular contando las células y testando el porcentaje de células NGF-positivas por análisis FACS, como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 5.

- 5 No se sobrepasa un volumen de 100 ml - 90 ml de la solución inicial y 10 ml de las cuentas pre-lavadas planificadas. Con este dispositivo puede tratarse un máximo de  $10 \times 10^9$  células sensibilizadas. El tiempo de incubación de la mixtura es 30 minutos a la temperatura ambiente.

10 Después de la mezclado, las células NGF+ agrupadas en rosetas son retenidas en la pared de la cámara primaria por el imán. Las células no agrupadas en rosetas se separan por lavado en la bolsa de desechos y posteriormente las células NGF+ se lavan tres veces con el tampón a fin de separar las células residuales no agrupadas en rosetas. El tampón de trabajo utilizado para el lavado se recoge junto con las células no agrupadas en rosetas y esta suspensión de células puede contarse finalmente a fin de controlar el resultado satisfactorio del procedimiento de selección.

15 Se condujeron dos experimentos diferentes utilizando el procedimiento arriba descrito. En estos experimentos se determinaron los parámetros siguientes: volumen inicial (el volumen de la suspensión de células en la cámara del conjunto de tuberías), volumen final de la suspensión de células a fin de concentrar las células  $\Delta$ LNGFR+ para cultivo después de la separación inmunomagnética, porcentaje de células NGF+ testadas por análisis FACS, número total de células  $\Delta$ LNGFR+, derivado del número inicial de células (detectado antes del lavado con CytoMate™) y porcentaje de células  $\Delta$ LNGFR+, duración del procedimiento total a fin de comprobar si el procedimiento consume menos tiempo comparado con un sistema abierto, el número de células suspendidas en la bolsa de desechos y el volumen del tampón de lavado utilizado a fin de evaluar el consumo de reactivos.

20 La Tabla 7 resume los datos de los dos experimentos realizados utilizando Isolex™.

**Tabla 7**

	Experimento 1	Experimento 2
Volumen inicial	130 ml	100 ml
Volumen final	80 ml	130 ml
% de células NGF positivas	20%	23%
Número inicial de células	$0,810 \times 10^9$	$1,13 \times 10^9$
Número total de células NGF positivas	$0,162 \times 10^9$	$0,260 \times 10^9$
Número final de células en la bolsa de desechos	-	$0,720 \times 10^9$
Consumo de tiempo	1 h 30 min	1 h 30 min
Volumen de tampón de lavado	500ml	500 ml

25 **Discusión**

El volumen inicial de las muestras depende de los pasos de lavado y sensibilización realizados con CytoMate™ que lavan aproximadamente 80 ml más el volumen añadido de cuentas prelavadas, siendo el volumen total aproximadamente 100 ml. No debe sobrepasarse un volumen de 130 ml, dado que el volumen de la cámara del conjunto de tuberías es 150 ml. Se requieren 20 ml de volumen residual para una mezclado satisfactoria entre células y cuentas.

30 El volumen final de la suspensión de células se fija basándose en el número total de células LNGFR-positivas. El volumen de la suspensión de células es el volumen de cultivo de células, y las células se extienden con una concentración de  $2 \times 10^6$  células LNGFR-positivas/ml de medio de cultivo. Después del lavado de las células agrupadas en rosetas, una bolsa con el volumen planificado de medio de cultivo se conecta asépticamente con un soldador estéril de tuberías (Terumo) que asegura conexiones asépticas.

35 El porcentaje de células LNGFR+ guarda relación con el paso de transducción y depende de diferentes factores que incluyen: estimulación de las células, método de transducción, título de virus del sobrenadante utilizado para transducción y número de ciclos de transducción.

40 Un porcentaje mayor de células LNGFR-positivas es muy importante debido a que el mismo mejora la recuperación de las células finales genéticamente modificadas y la eficiencia del procedimiento global.

5 El número total de células LNGFR-positivas en relación con el número inicial de células y con el porcentaje de células LNGFR-positivas es importante a fin de preparar los reactivos para selección, el número de cuentas y el tampón de trabajo a utilizar, y a fin de evaluar la recuperación de las células después de la selección (es decir la eficiencia del paso de selección). La recuperación de las células se evalúa el día siguiente a la selección cuando la regulación decreciente de la molécula  $\Delta$ LNGFR libera las cuentas en el medio de cultivo. Las células se testan respecto a número de células utilizando tinción con azul tripán. Estos resultados se presentan en la Tabla 8 y están, como se expone detalladamente en el Ejemplo 8, dentro del valor medio de los resultados de recuperación obtenidos en un sistema abierto.

10 La suspensión final de células se sometió a recuento en uno de los dos experimentos a fin de evaluar el resultado del procedimiento de selección. Durante el procedimiento se pierden menos de 10% de las células totales.

15 El procedimiento de selección no consume mucho tiempo comparado con un método de selección abierto en el cual la suspensión de células tiene que dividirse al menos en 3 tuberías y cada tubería tiene que aplicarse a un imán. Asimismo, los pasos de lavado siguientes sobre las células agrupadas en rosetas tienen que realizarse en varios tuberías y cada tubería aplicarse a un imán, lo cual consume mucho tiempo. Además, la manipulación de varios tuberías en una cabina de flujo laminar está asociada con un riesgo de contaminación alto comparada con la manipulación de las células en el conjunto de tuberías.

### **Separación de las microesferas inmunomagnéticas**

20 Las Dynabeads® (Baxter) IgG M-450 anti-ratón de oveja son cuentas paramagnéticas de poliestireno con IgG anti-ratón de oveja purificada por afinidad, unidas covalentemente a la superficie. La suspensión estéril no pirogénica está destinada únicamente a uso ex vivo. Por esta razón, las cuentas tienen que separarse de la suspensión de células. Como se ha descrito arriba, el día después de la selección, las células agrupadas en rosetas liberan las cuentas en el medio de cultivo. Después de ello, la suspensión de células se trata con el sistema magnético de separación de células a fin de separar las cuentas del cultivo de células.

Se utiliza un conjunto de tuberías con una cámara como se describe en la sección anterior.

25 Resumidamente, las dos bolsas de la línea de entrada y las dos bolsas de la línea de salida se conectan asépticamente con un soldador de tuberías estéril (Terumo) que asegura conexiones asépticas o con el uso de las espigas de las líneas a insertar en las aberturas de las bolsas. Las bolsas conectadas de la línea de entrada son: la bolsa de tampón (el tampón es el medio de cultivo) y la bolsa de suspensión de células. Las bolsas conectadas de la línea de salida son: la bolsa de suspensión de células final, para recuperación de las células, y la bolsa de desechos.

30 Después de las conexiones, se inicia el programa de ajuste fijado con esta secuencia de pasos: cebado del conjunto de tuberías con el tampón de lavado, mezcla de las células sensibilizadas en la cámara con las cuentas, añadidas antes de la incubación en la bolsa de células inicial, separación magnética de las rosetas, eliminación por lavado de las cuentas residuales y las células negativas.

35 Únicamente se utiliza el conjunto de lavado para los propósitos de los inventores: las cuentas son retenidas en la pared de la cámara por el imán mientras que las células se recogen en la bolsa final.

Se condujeron dos experimentos diferentes utilizando el procedimiento arriba descrito. El paso de selección de las células de estos experimentos se describe en la sección anterior.

40 En estos experimentos, se evaluó la recuperación de las células a fin de comparar la selección y el desprendimiento de la presente invención realizados en un sistema cerrado con la selección y el desprendimiento realizados en un sistema abierto.

La Tabla 8 resume la recuperación de las células después del desprendimiento de las cuentas realizado utilizando Isolex™ 300.

**Tabla 8**

	Experimento 1	Experimento 2
Número total de células NGF positivas antes de la selección	0,162 x 10 <sup>9</sup>	0,260 x 10 <sup>9</sup>
Número total de células NGF positivas después de la selección	0,124 x 10 <sup>9</sup>	0,173 x 10 <sup>9</sup>
Recuperación de células	77%	66%

Como se expone detalladamente en el Ejemplo 8, los resultados de la recuperación de células en los experimentos 1 y 2, en los cuales la selección y el desprendimiento se realizan en un sistema cerrado, están dentro de los valores medios de los resultados obtenidos para selección y desprendimiento realizados en un sistema abierto.

### Ejemplo 7

#### 5 **Cultivo de linfocitos después de la selección**

Después del desprendimiento de las cuentas, las células se cultivan durante 24 horas. Las células se someten a recuento utilizando tinción con azul tripán y la expresión de  $\Delta$ LNCFR se evalúa por análisis FACS, a fin de testar la homogeneidad de la población seleccionada.

10 Las células cultivadas en bolsas se diluyen luego en medio de cultivo hasta un intervalo de concentración comprendido entre 0,2 y  $1 \times 10^6$  células/ml, añadiendo el medio con utilización de un soldador estéril de tuberías (Terumo) que asegura conexiones sépticas entre las bolsas.

15 Usualmente, la molécula  $\Delta$ LNCFR se expresa ya en más del 90% de la población. Sin embargo, dependiendo de la tasa de proliferación celular, puede ser que no todas las células expresen la molécula de la superficie celular en este momento puntual, dando como resultado una población no homogénea. En cualquier caso, se repite el mismo análisis por citofluorometría el último día del cultivo antes de la infusión al paciente o la congelación de las células a fin de confirmar que la población de células está genéticamente modificada por completo.

Los días de cultivo después de la selección están dentro de un intervalo comprendido entre 0 y 6, dependiendo del número de células planificadas en el estudio clínico para la infusión a cada paciente; se utiliza una parte alícuota de la población para análisis de control de calidad, que incluyen el test de esterilidad.

20 De acuerdo con la Farmacopea Europea (EP), se testa una parte alícuota del producto; el volumen de la parte alícuota depende del volumen total del producto. Basándose en consideraciones estadísticas, puede admitirse que si esta parte alícuota no da lugar a crecimiento bacteriano, cuando se ensaya en el test de esterilidad, el producto total puede considerarse como estéril.

25 Sin embargo, no puede excluirse por completo la presencia de contaminantes a una carga extremadamente baja en el producto final. Este riesgo puede minimizarse utilizando un sistema de cultivo de células tal como el de la presente invención, cuya principal ventaja es la manipulación de las células en un sistema totalmente cerrado.

En el caso presente, la seguridad del producto final está garantizada por el sistema propiamente dicho, dado que, en todos y cada uno de los pasos de la producción, las células no están nunca en contacto con el ambiente.

30 Las células se manipulan siempre en conjuntos de tuberías estériles y se tratan con reactivo preparados en bolsas estériles; así pues, el ambiente aséptico se garantiza con total seguridad.

#### **Lavado y recuperación del producto final utilizando CytoMate™**

En este paso, se recupera el producto final, se lava a fin de eliminar el medio de cultivo y se concentra luego en 50-60 ml de volumen final a fin de infundirse al paciente o congelarse para una infusión futura.

35 En los experimentos que siguen, el tampón utilizado para lavado de las células es PBS adicionado de 0,5% de HSA, pero para un protocolo clínico de terapia génica tiene que utilizarse una solución de cloruro de sodio al 0,9% con 0,5-4% de HSA a fin de preservar mejor un ambiente fisiológico para las células y a fin de preparar un producto fisiológico, adecuado para infusión al paciente.

40 Los pasos de lavado y concentración se realizan como se describe en el Ejemplo 4 en un conjunto estéril desechable constituido por la membrana rotativa conectada a una bolsa de lavado filtrado, una bolsa de tampón y una bolsa de desechos. La bolsa de muestra con los linfocitos modificados genéticamente y la bolsa final para recuperación de las células están cortadas asépticamente al conjunto.

Como se ha mencionado anteriormente, este sistema permite el procesamiento de las células en un ambiente estéril.

45 El procedimiento de lavado se define por el usuario y es el mismo que se describe en el Ejemplo 4. Las células se lavan con dos ciclos utilizando el tampón que acaba de describirse, con el uso de la membrana rotativa, y se transfieren a una bolsa de recogida, la bolsa de lavado. Las células se transfieren luego a la bolsa de recuperación final en un volumen programado de 50-60 ml, y la bolsa de lavado y las tuberías se enjuagan con un volumen fijado del tampón a fin de reducir la pérdida de células.

50 Como se ha descrito arriba, el producto final, las células genéticamente modificadas, en la bolsa de recuperación final, puede suspenderse en solución salina complementada con 0,5-4% de HSA para infusión o con 0,5-4% de HSA y 10% de DMSO para congelación de las células.

Antes de la infusión o congelación, se controla una parte alícuota del producto final respecto a calidad con los tests requeridos por las normas europeas.

5 La eficiencia y duración del paso de lavado dependen del parámetro "multiplicidad de reducción de residuos" seleccionado; se eligió el valor de 50 basándose en los datos de Nexell; el valor de 100 dará como resultado una reducción aproximada de 2-log de la solución fuente.

La duración del procedimiento de lavado y concentración es aproximadamente 1 hora.

10 Se condujeron dos experimentos independientes utilizando el procedimiento de lavado que acaba de describirse. En estos experimentos, se analizaron los parámetros siguientes: volumen inicial (el volumen de la suspensión de células en la bolsa de muestra), número inicial de células y número final de células a fin de testar la pérdida de células durante el paso de lavado, el volumen del tampón de lavado utilizado a fin de evaluar el consumo de reactivos y la duración del procedimiento total. El último punto es muy importante en este paso, en el cual la viabilidad de las células es una cuestión fundamental.

La Tabla 9 resume los datos de los dos experimentos de lavado realizados utilizando CytoMate™.

**Tabla 9**

	Experimento 1	Experimento 2
Volumen inicial	320 ml	640 ml
Volumen final	58 ml	58 ml
Número inicial de células	0,249 x 10 <sup>9</sup>	0,640 x 10 <sup>9</sup>
Número final de células	0,240 x 10 <sup>9</sup>	0,580 x 10 <sup>9</sup>
Recuperación	96%	93%
Tiempo	55 min	40 min
Volumen de tampón de lavado	800 ml	1034 ml

15 El volumen inicial de las muestras depende del número de células en el paso anterior de división cuando las células se cultivan a razón de 0,2-1 x 10<sup>6</sup> células/ml de medio de cultivo.

El volumen final de células en la bolsa de recuperación es ajustado en el programa por el usuario y preferiblemente no excede de 60 ml a fin de minimizar el volumen a inyectar al paciente.

20 El número inicial y el número final de células son datos muy útiles a fin de evaluar la pérdida de células durante el procedimiento y para propósitos de estudios clínicos a fin de planificar la dosis a inyectar al paciente definida usualmente, en estudios clínicos de terapia génica (Bibliografía), como número de células/kg de peso del paciente.

Como se describe en el Ejemplo 4, el procedimiento con CytoMate™ es muy breve.

25 En este paso, en el cual las células finales recuperadas son el producto final, el tiempo total de manipulación de las células tiene que minimizarse a fin de preservar la viabilidad de las células hasta la inyección al paciente o la congelación de las células. Los tests de estabilidad, realizados en los laboratorios de los inventores, acerca de la viabilidad del producto final suspendido en cloruro de sodio al 0,9% con 4% de HSA indican que la suspensión de células mantiene la estabilidad durante 4 horas: por tanto, 1 hora es un tiempo adecuado para este paso del proceso.

30 Se evaluó la viabilidad del producto, encontrándose que era 96-97% en los dos experimentos, en tanto que la pérdida de células durante el paso de lavado era 4-7%. Este resultado asegura la calidad del producto final para inyección al paciente o congelación.

35 De acuerdo con estos datos, el proceso de lavado realizado en un sistema cerrado a fin de preparar el producto final, las células genéticamente modificadas para inyección o para congelación, no consume mucho tiempo y la calidad y la seguridad de las células procesadas están perfectamente preservadas: las células se transfieren, durante las operaciones de lavado, desde la bolsa inicial a la bolsa final de infusión o congelación a través de un conjunto de tuberías y el control de la calidad del producto se efectúa extrayendo una parte alícuota del producto con una jeringuilla estéril.

**Ejemplo 8**

40 **Comparación entre los sistemas abierto y cerrado**

Como se ha explicado detalladamente en los ejemplos anteriores, la presente invención proporciona un método para transducción y selección de células genéticamente modificadas en un sistema cerrado seguro y estandarizado para uso clínico.

5 En particular, la presente invención se utilizó (véanse los ejemplos anteriores) para la producción de células T genéticamente modificadas, destinadas a utilización en el contexto de protocolos clínicos de trasplante alogénico de médula ósea.

Actualmente se utiliza un sistema abierto para producción de células T transducidas para protocolos clínicos. Los pasos de este sistema se han resumido anteriormente e incluyen: estimulación, transducción, selección, expansión y cosecha.

10 En cada ejemplo, se describió un solo paso junto al desarrollo del paso a un sistema cerrado.

La transformación de un sistema abierto a un sistema cerrado es necesaria para la escalación del producto y se hace precisa a fin de mejorar la seguridad del producto para uso clínico.

15 En la experiencia de los autores de la invención, puede utilizarse un sistema abierto sin riesgo importante de contaminación, si se requiere un número limitado de células ( $1-1,2 \times 10^8$  células finales, dosis al paciente  $10^6$  células/kg).

En cambio, cuando el protocolo clínico requiere dosis elevadas ( $10^7$  o  $10^8$  células/kg), se producen  $0,8-8 \times 10^9$  células finales y es necesario un sistema cerrado a fin de reducir el riesgo de contaminación y facilitar la manipulación de las células.

20 Con este propósito, se desarrolló en los laboratorios de los inventores un sistema cerrado fácilmente aplicable. Como se explica en cada paso arriba descrito, este sistema asegura la manipulación aséptica de una cantidad mayor de células comparado con un sistema abierto. Dado que no existe paso abierto alguno, la manipulación total puede realizarse en laboratorios convencionales.

El método puede estandarizarse en dispositivos de protocolo a fin de ser utilizado por una amplia gama de operadores de laboratorio.

25 En la tabla que sigue se resumen dos experimentos detallados extensamente en los Ejemplos anteriores, y se comparan paso a paso con experimentos realizados en un sistema abierto.

Cada valor del sistema abierto es la media de 5 experimentos conducidos utilizando células de 5 donantes diferentes recuperadas por aféresis, mientras que los dos experimentos realizados con el sistema cerrado se realizaron partiendo de un plasma coagulado y una aféresis.

30

Tabla 10

	Día2/Día0	Día3/Día2	Día6/Día3	%NGF MF1 antes del ajuste	MFI Antes de la selección	% Recuperación	Día10/Día7	% final NGFR	% final NGFR	Día10/Día0	Nº de células finales x 10e6
Sistema abierto (5 donantes)	0,41	1,3	3,7	15	507	34	5	95	580	0,35	568
Sistema cerrado (plasma coagulado)	0,2	1,2	3,6	20	622	77	2	96	519	0,26	249
Sistema cerrado (aféresis)	0,49	0,89	2,5	23	364	67	3,6	94	462	0,64	640

- La expresión Día2/Día 0 muestra la ratio entre los números de células testados el día 2 y el día 0. Esta ratio indica la tasa de proliferación celular hasta el día 2. El mismo significado tienen las ratios Día3/Día 2 y Día6/Día 3.
- 5 - La expresión % células NGFR+ antes de la selección indica el número de células transducidas, genéticamente modificadas con el vector SFCMM-3, descrito en el Ejemplo 2, que codifica la molécula Tk y la molécula de expresión de la superficie celular  $\Delta$ NGFR. Este valor se detectó antes del paso de selección utilizando un análisis por citofluorometría.
- MFI es la intensidad media de fluorescencia y es un parámetro del análisis por citofluorometría que guarda relación con la cantidad de moléculas celulares expresadas en la superficie celular.
- 10 - El % de recuperación es la ratio entre el número total de células recogido después del paso de selección y el número total de células transducidas antes del paso de selección.
- El porcentaje final de células NGFR indica el número de células genéticamente modificadas en el producto final.
- 15 - El N° de células finales es el número de células genéticamente modificadas recogidas el día de la infusión al paciente o el día de congelación de las células.
- Los momentos puntuales son: día 0, el día de la estimulación de las células; día 2, el día de transducción; día 6, el día de selección; día 7, el día de desprendimiento de las cuentas; día 10, el día de recuperación del producto final.

20 Los experimentos pueden compararse dado que los mismos se realizaron partiendo de un número similar de células: un valor medio de  $1622 \times 10^6$  células para los 5 experimentos en sistema abierto, y  $932-1000 \times 10^6$  células para los experimentos en el sistema cerrado.

- La tabla muestra que el experimento conducido con el sistema cerrado, partiendo de aféresis, es muy eficiente y el número de células genéticamente modificadas producidas de hecho es mayor que el producido con sistema abierto, partiendo también de aféresis.
  - 25 • Un análisis detallado del proceso indica que los pasos en los cuales el sistema cerrado presenta mayores ventajas son la transducción y la selección, en los cuales la recuperación de las células es muy alta.
- La pureza (porcentaje final de células NGFR-positivas) del producto final es muy similar y demuestra la homogeneidad de la población final de células genéticamente modificadas.
- Únicamente la tasa de proliferación es menor en el sistema cerrado que en el sistema abierto, especialmente entre los días 3 y 6 y entre los días 10 y 7. Sin embargo, el desarrollo del cultivo de células utilizando diferentes bolsas o diferentes medios de cultivo debería mejorar la proliferación celular.
  - 30

Estos resultados demuestran que la presente invención proporciona un método para transducción y selección de células genéticamente modificadas en un sistema cerrado estandarizado que es seguro y eficiente.

35 La presente invención testada en el contexto de protocolos clínicos para trasplante alogénico de médula ósea puede aplicarse a varios estudios clínicos de terapia génica en los cuales son necesarias seguridad y eficiencia.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para transducción de células con un constructo genético y selección de células genéticamente modificadas, caracterizado por comprender el método el llevar a cabo la transducción y selección en un sistema cerrado, en donde las células se lavan, se concentran, se transducen y se resuspenden utilizando un dispositivo de manipulación automático de fluidos sin transferencia manual alguna de fluidos, y en donde el método comprende selección inmunomagnética de las células transducidas.
2. Un método de modificación de células caracterizado porque comprende:
  - (i) la descongelación opcional de dichas células;
  - (ii) la estimulación opcional de dichas células;
  - (iii) la transducción de dichas células con un constructo genético;
  - (iv) la selección de las células transducidas;
  - (v) la expansión opcional y la cosecha de dichas células transducidas;
  - (vi) en el cual los pasos (i) a (v) se realizan en un sistema cerrado, y en el cual el paso (iv) comprende la selección inmunomagnética de las células transducidas; y
  - (vii) en el cual las células se lavan, concentran, transducen y resuspenden utilizando un dispositivo automático de tratamiento de fluidos sin transferencia manual alguna de los fluidos.
3. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque en el mismo el constructo genético es un vector retroviral.
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado por ser en el mismo el vector retroviral un vector derivado de MLV.
5. Un método de acuerdo con la reivindicación 3 ó 4, caracterizado porque en el mismo el vector retroviral codifica un marcador de la superficie celular.
6. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado porque en el mismo el marcador de la superficie celular es  $\Delta$ LNGFR.
7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque en el mismo las células son células T donantes.
8. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque en el mismo el método comprende un paso de transducción que utiliza fibronectina o una variante de la misma.
9. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque en el mismo el método comprende un paso de transducción utilizando el sistema RetroNectin®.
10. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque en el mismo el método utiliza un solo dispositivo.
11. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque en el mismo el método utiliza dos o más dispositivos para concentración de las células, lavado de las células, transducción, cambio de medio y selección inmunomagnética de las células transducidas.
12. Un método de acuerdo con la reivindicación 11, caracterizado porque en el mismo el método utiliza
  - (i) un primer dispositivo para concentración de las células, lavado de las células, transducción y cambio de medio; y
  - (ii) un segundo dispositivo para selección inmunomagnética de las células transducidas.
13. Un método de acuerdo con la reivindicación 11 ó 12, caracterizado porque en el mismo la transferencia de las células entre los dispositivos se lleva a cabo utilizando bolsas selladas y conexiones asépticas.
14. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, caracterizado porque en el mismo una membrana rotativa asegura la filtración de las células, contra una circulación de tampón en contracorriente, y está conectada a diferentes bolsas, en un sistema totalmente cerrado que permite programación paso a paso definible por el usuario.
15. Un método de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizado porque en el mismo (i) se realiza utilizando un Sistema de Procesamiento de Células CytoMate™ o una variante del mismo.

16. Un método de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizado porque en el mismo (ii) se realiza utilizando un Sistema Magnético de Separación de Células Isolex™ 300 o una variante del mismo.

Diagrama de flujo de proceso  
Células modificadas genéticamente para uso clínico

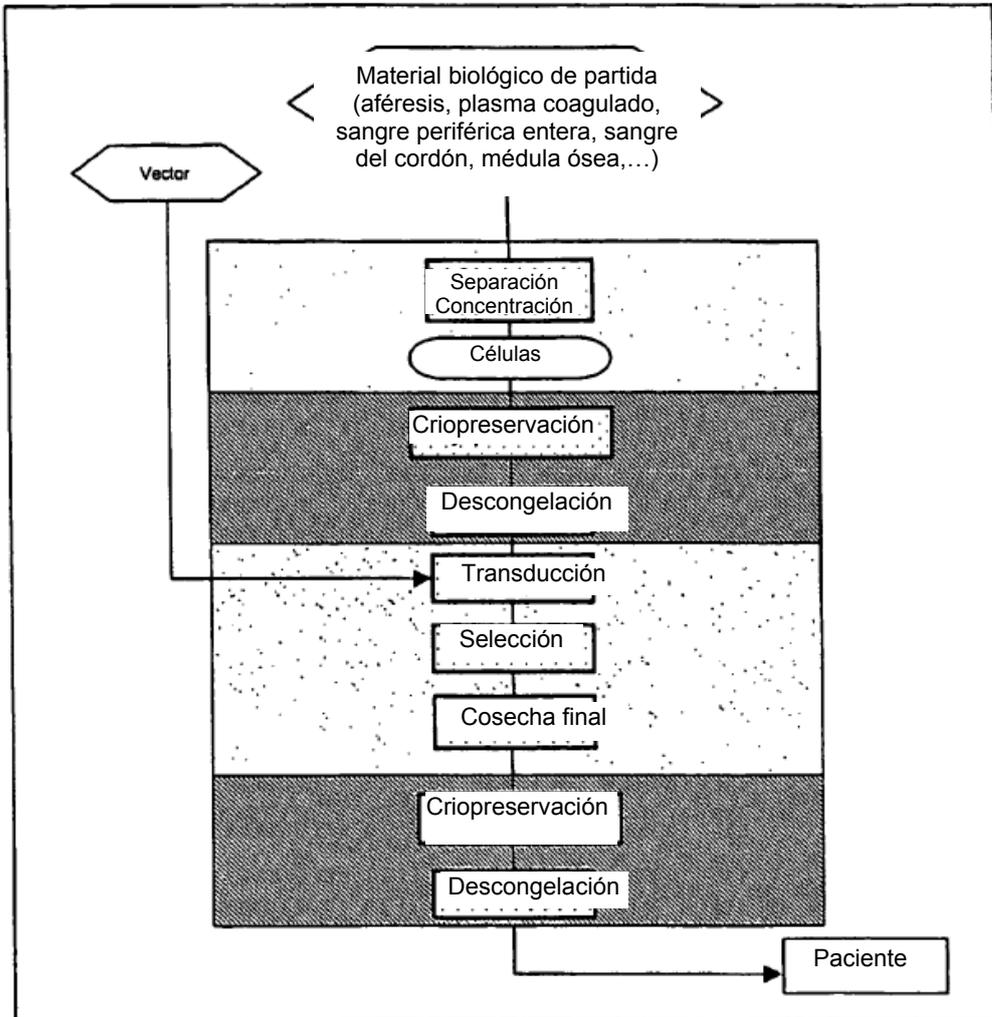


Figura 1

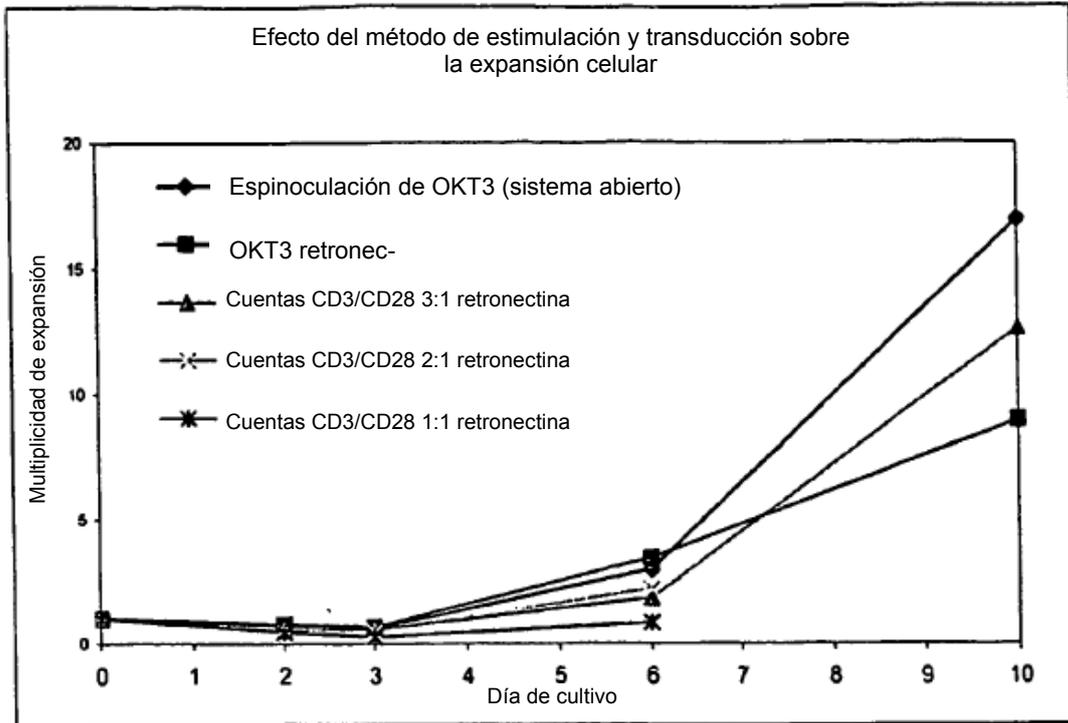


Figura 2

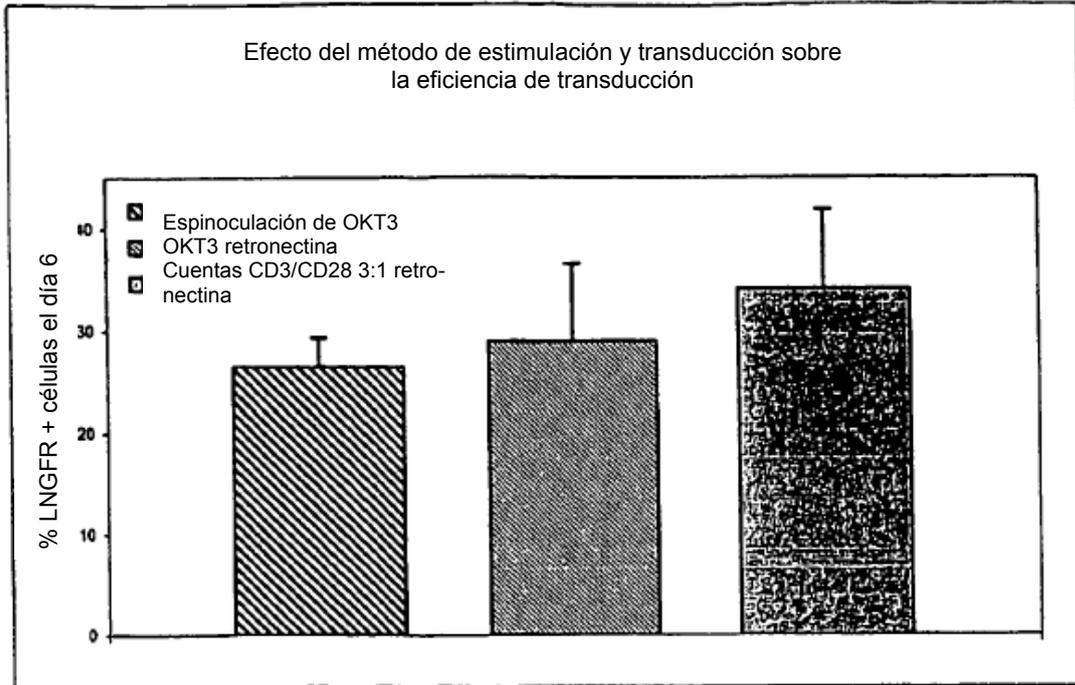


Figura 3

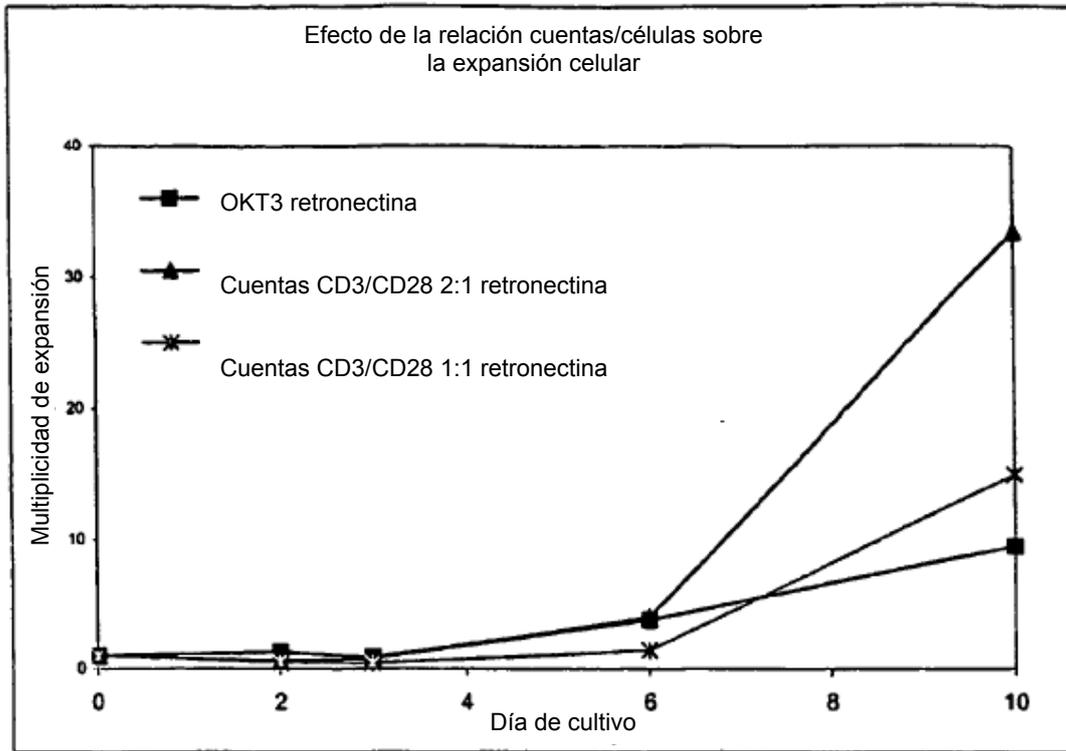


Figura 4

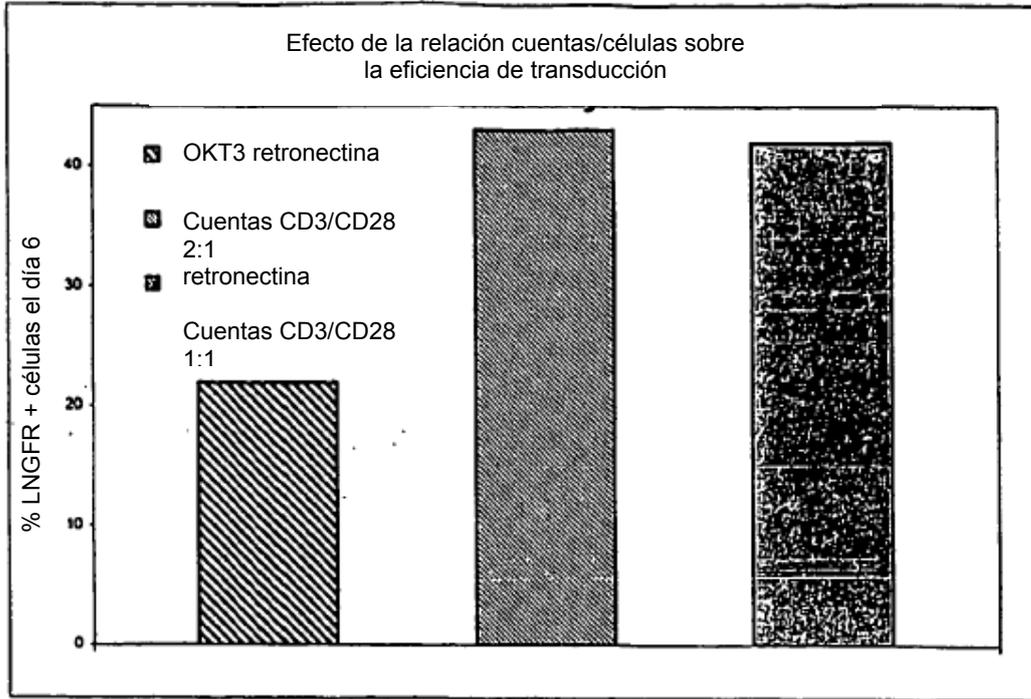


Figura 5

**Referencias citadas en la descripción**

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es para comodidad del lector únicamente. No forma parte del documento de la patente europea. Aun cuando se tuvo gran cuidado al reunir las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la Oficina Europea de Patentes (EPO) declina toda responsabilidad a este respecto.

**5 Literatura no de patentes citada en la descripción**

- Thomas, *J Clin Oncol*, 1983, vol. 1, 517 [0003]
- O'Reilly, *Curr Op In Hematol*, 1993, 221 [0003]
- Papadopoulos, *N Engl J Med*, 1994, vol. 330, 1185 [0005]
- 10 • Rooney, *The Lancet*, 1995, vol. 345, 9 [0005]
- Heslop, *Nature Med*, 1996, vol. 2, 551 [0005]
- Rooney, *Blood*, 1998, vol. 92, 1549 [0005]
- Riddel, *Science*, 1992, 257 [0005]
- Walter, *N Engl J Med*, 1995, vol. 333, 1038 [0005]
- 15 • Kolb, *Blood*, 1995, vol. 86, 2041 [0006]
- Collins, *J Clin Oncol*, 1997, vol. 15, 433 [0006]
- Porter, *Blood*, 2000, vol. 95, 1214 [0006]
- Smee, *Antimicrobials Agents and Chemotherapy*, 1983, vol. 4, 504 [0009]
- Bordignon, *Hum Gene Ther*, 1995, vol. 2, 813 [0009] [0011]
- 20 • Bonini, *Science*, 1997, vol. 276, 1719 [0009] [0011]
- Tiberghien, *Hum Gene Ther*, 1997, vol. 8, 615 [0009] [0011]
- Tiberghien, *Blood*, 2001, vol. 97, 63 [0009] [0011]
- Link, *Hum Gene Ther*, 1998, vol. 9, 115 [0009] [0011]
- Champlin, *Blood*, 1999, vol. 94, 1448 [0009] [0011]
- 25 • Mavilio, *Blood*, 1994, vol. 83, 1988 [0010]
- Moritz et al., *J Clin Invest.*, 1994, vol. 93, 1451 [0022]
- Moritz et al., *Blood*, 1996, vol. 88, 855 [0022]
- Hanenberg et al., *Nature Medicine*, 1996, vol. 2, 876 [0022]
- Kimizuka et al., *J. Biochem.*, 1991, vol. 110, 284 [0022]
- 30 • Calmels B. et al., *Bone Marrow Transplant*, 2003, vol. 31, 823 [0036]
- Suen, *Cytotherapy*, 2001, vol. 3, 365 [0036]
- Calmels B. et al., *Bone Marrow Transplant*, May 2003, vol. 31 (9), 823-8 [0055] [0065]
- Calmels B. et al., *Bone Marrow Transplant*, May 2003, vol. 31 (9), 823-8 [0065]
- 35 • Verzeletti et al., HSV-TK gene transfer for controlled GvHD and GvL: clinical follow-up and improved new vectors, *Human Gene Therapy*, 1998 [0091]