

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 635 868**

51 Int. Cl.:

A61K 35/14 (2015.01)

C12N 5/0786 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.03.2005 PCT/US2005/006446**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.09.2005 WO05084276**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2005 E 05724065 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017 EP 1749090**

54 Título: **Método y composición de formulación de terapia celular**

30 Prioridad:

01.03.2004 US 549032 P

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

05.10.2017

73 Titular/es:

**IMMUNOVATIVE THERAPIES, LTD. (100.0%)
Misgav Technology Center M.P.
20179 Misgav, IL**

72 Inventor/es:

HAR-NOY, MICHAEL

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 635 868 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).

Método y composición de formulación de terapia celular**Descripción**5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] Esta invención se refiere a métodos para proceso de formulación de células T ex-vivo preparadas para la infusión y una composición que comprende una cantidad eficaz de tratamiento de las células T formuladas para infusión por los métodos.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Los métodos de la terapia celular se han desarrollado con el fin de potenciar la respuesta inmune del huésped a los tumores, virus y patógenos bacterianos. Los métodos de terapia celular a menudo implican la activación ex-vivo y la expansión de células T. Ejemplos de este tipo de tratamientos incluyen el uso de células de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) (véase la Patente de Estados Unidos N° 5.126.132 concedida a Rosenberg), células T citotóxicas (véase la Patente de Estados Unidos N° 6.25.073 concedida a Cai et al., y Patente de Estado Unidos N°5.846.827 concedida a Celis, et al.), células de nódulos linfáticos drenantes de tumor expandido (véase la Patente de Estado Unidos N° 6.251.385 concedida a Terman), y varias otras preparaciones de linfocitos (véase la Patente de Estados Unidos N° 6.194.207 concedida a Bell, et al. Patente de Estados Unidos N° 5.443.983 expedida a Ochoa, et al., Patente de Estados Unidos N° 6.040.177 concedida a Riddell et al., Patente de Estados Unidos N° 5.766.920 expedida a Babbitt, et al.).

15

20

25

[0003] Lum LG et al: "Immune Modulation in Cancer Patients After Adoptive Transfer of Anti-CD3/Anti-CD28-Costimulated T Cells-Phase I Clinical Trial", Journal of Immunotherapy, 24 (5): 408-419, 2001-09, describe células mononucleares de sangre periférica (PBMC) activadas en cultivo celular con perlas recubiertas con anti-CD3/anti-CD28. Cuando se necesita para la infusión, las células activadas, con las perlas eliminadas, se lavan y se suspenden en un medio de infusión.

[0004] Para obtener la máxima eficacia de las células T en protocolos de terapia celular, la población de células T activada ex vivo debe estar en un estado de activación máxima tras la infusión. Los esfuerzos para desarrollar métodos mejorados para producir células T más eficaces para uso en protocolos de terapia celular se han centrado en los métodos de activación ex vivo. Sin embargo, las células activadas ex vivo necesitan ser cosechadas y administradas a los pacientes para tener un efecto terapéutico. La recolección de las células T elimina los estímulos activadores disponibles en los cultivos ex vivo. Por lo tanto, cuanto más largo sea el tiempo desde la cosecha a la infusión, menor será la calidad de las células T.

30

35

40

[0005] Hay una necesidad de desarrollar formulaciones de células T para la infusión que mantienen las células en un estado que puede orquestar maximalmente una respuesta inmune al cáncer, enfermedades infecciosas y otros estados de enfermedad, tanto en el momento de la infusión como mientras que circulan en la sangre. Los esfuerzos para mantener el estado de activación de las células T en el momento de la infusión han implicado más comúnmente la formulación de las células T con IL-2 exógena. La administración sistémica de IL-2 a pacientes también se ha utilizado para mantener el estado de activación de las células T después de la infusión. Sin embargo, administración de IL-2 exógena es extremadamente tóxica para los pacientes y no ha dado como resultado un beneficio significativo para los pacientes sometidos a infusiones de células T.

45 RESUMEN DE LA INVENCION

[0006] Esta invención incluye células T preparadas ex vivo que se cosechan a partir de condiciones de cultivo celular y formuladas en medios adecuados para perfusión. El método de formulación implica: (1) marcar las células con uno o más agentes que tienen reactividad para los movimientos superficiales de las células T capaces de suministrar señales de activación tras la reticulación; (2) mezclar las células marcadas con nanoesferas o microesferas biodegradables recubiertas con un material capaz de reticular los agentes unidos a los restos de la superficie de las células T; (3) suspender la mezcla de células T marcadas y esferas de reticulación biodegradables recubiertas en un medio adecuado para infusión; (4) envasar la mezcla en un recipiente adecuado, tal como una jeringa o una bolsa de infusión intravenosa; y (5) administración parenteral de dicha mezcla a un paciente.

50

55

[0007] Alternativamente, la invención puede lograrse con un método de formulación que implica: (1) mezclar una población de células T con las esferas nano biodegradables o microesferas recubiertas con un primer material y uno o más segundos materiales, mientras que el primer material se une a los segundos materiales y los segundos materiales tienen reactividad para los restos superficiales en las células T, y mientras que la interacción de los segundos materiales con las células T provoca la activación de las células T; (2) suspender la mezcla de células T y las esferas biodegradables en un medio adecuado para infusión; y (3) envasar la mezcla en un recipiente adecuado, tal como una jeringa o una bolsa de infusión intravenosa; y (4) administración parenteral de la mezcla a un paciente.

60

[0008] En la práctica de la presente invención, las células T destinadas a introducirse se cosechan primero desde el entorno de cultivo celular ex vivo. Las células cosechadas se formulan inmediatamente para infusión, se criopreservan para una formulación posterior o se envían a la localización del paciente para la formulación.

5 **[0009]** Tras la formulación por el método de la presente invención, todas las células T para la infusión se activarán al máximo en un vehículo de suministro no tóxico.

10 **[0010]** Para los fines de la presente invención, todas las referencias a las células T incluyen una población de células con al menos una parte de las células que contienen células T. Las células T son células que expresan TCR, incluyendo TCR α/β y γ/δ . Las células T incluyen todas las células que expresan CD3, incluyendo subconjuntos de células T que también expresan CD4 y CD8. Las células T incluyen células tanto naive como de memoria y células efectoras tales como CTL. Las células T también incluyen células reguladoras tales como células Th1, Tc1, Th2, Tc2, Th3, Treg y Tr1. Las células T también incluyen células NKT y clases únicas similares del linaje de células T.

15 FORMAS DE REALIZACIÓN REFERIDAS

20 **[0011]** Las esferas biodegradables de la presente invención se fabrican preferiblemente de poliésteres alifáticos, tales como poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), copolímeros de PLA y PGA (PLGA) o poli(carprolactona) (PCL), y polianhídridos. Las esferas se producen en tamaños de partícula pequeña de 0,1 a 500 micras, preferiblemente menos de 10 micrómetros y lo más preferiblemente menos de 1 micrómetro. Las microesferas de esta gama de tamaños son capaces de inyección directa en el cuerpo por métodos convencionales. Se prefiere que las esferas revestidas se diseñen para degradarse en fluidos fisiológicos dentro de 7 días, más preferiblemente dentro de 3 días.

25 **[0012]** El primer material preferido para el recubrimiento sobre las esferas biodegradables es anticuerpos policlonal anti-ratón policlonales de cabra (o de oveja). A modo de ejemplo, este primer material preferido puede usarse para reticular anticuerpos monoclonales derivados de ratón, o fragmentos o derivados genéticamente modificados, que tienen especificidad para restos de superficie de células T. Así, por ejemplo, la mezcla de microesferas (o nanoesferas) anti-ratón revestidas de cabra con células T humanas marcadas con CD3 anti-humano de ratón y mAb CD28 anti-humano de ratón provocará la reticulación de los mAb de ratón sobre las células T humanas a través de la unión del anticuerpo policlonal anti-ratón de cabra con los mAbs de ratón. La reticulación de los mAbs causa la activación de las células T. Alternativamente, el CD3 anti-humano y el anti-CD28 también pueden unirse primero, preferiblemente en una relación 50/50, en las esferas revestidas con anticuerpo policlonal de cabra (o oveja) y mezclarse con las células T. Será evidente para los expertos en la técnica que se pueden usar muchas combinaciones de primeros materiales y segundos materiales para lograr el objetivo de reticular segundos agentes unidos a restos de superficie de células T con el fin de iniciar la transducción de señales y la activación de células T.

35 **[0013]** La mezcla de células T con restos de superficie reticulados se suspende en medio de infusión (por ejemplo, soluciones isotónicas tales como solución salina normal, dextrosa al 5%, Plasma-Lito (Baxter) o Normasol (Abbott)). En algunas formas de realización, el medio de infusión se suplementa con albúmina de suero humano (HSA) al 0,5%-10%.

40 **[0014]** La mezcla se ajusta preferiblemente a una concentración de células T final de entre 1×10^7 a 1×10^8 células por ml de medio de infusión. En una realización preferida, 10^9 células T se formulan en 100 ml de medio de infusión. La formulación se envasa entonces en uno o más recipientes, tales como jeringas, bolsas de plástico o botellas de plástico.

45 **[0015]** Según un aspecto, la invención proporciona una composición que comprende una cantidad eficaz de tratamiento de las células, de las cuales una parte son las células T, en donde las células T han sido recogidas a partir de cultivo celular y se eliminan de esta manera de estímulos de activación en el cultivo y las células T recogidas se formulan para infusión por un método que comprende (1) poner en contacto las células T con uno o más agentes que ligan un resto de superficie celular sobre al menos una parte de las células T, (2) reticular uno o más agentes con nanoesferas o microesferas biodegradables recubiertas con un material capaz de reticular uno o más agentes, (3) suspender las células T, uno o más agentes y las nanoesferas o microesferas biodegradables revestidas en un medio de infusión, y (4) envasar en un recipiente adecuado, en el que las células T están en un estado activado en el medio.

50 **[0016]** En una realización, el medio es adecuado para infusión parenteral.

60 **[0017]** En otra realización, el recipiente es colapsable.

[0018] En una realización adicional, el recipiente tiene una parte de jeringa.

65 **[0019]** Según otro aspecto, la invención proporciona un método para la preparación de una cantidad eficaz de tratamiento de las células, de las cuales una parte son las células T, en las que las células T han sido cosechadas a partir de cultivo celular y se eliminan de esta manera de estímulos de activación en el cultivo, comprendiendo el

procedimiento la formulación de las células T recolectadas para infusión por un método que comprende: (1) marcar las células T obtenidas con uno o más agentes que tienen reactividad para restos de superficie de células T capaces de suministrar señales de activación tras la reticulación; (2) mezclar las células con láminas con nanoesferas o microesferas biodegradables recubiertas con un material capaz de reticular los agentes unidos a los restos de la superficie de las células T; (3) suspender la mezcla de células T marcadas y esferas de reticulación biodegradables recubiertas en un medio de infusión, con lo que las células T están en estado activado; y (4) envasar la mezcla en un recipiente adecuado.

[0020] De acuerdo con un aspecto adicional, la invención proporciona un método para la preparación de una cantidad eficaz de tratamiento de las células, de las cuales una parte son las células T, en el que las células T han sido cosechadas a partir de cultivo celular y se eliminan de esta manera a partir de estímulos de activación en el cultivo, comprendiendo el método la formulación de las células T recolectadas para infusión por un método que comprende: (1) mezclar una población de las células T cosechadas con nanoesferas o microesferas biodegradables recubiertas con un primer material y uno o más segundos materiales; en el que el primer material reticula los segundos materiales y los segundos materiales tienen reactividad para restos superficiales en las células T y en donde la interacción de los segundos materiales con las células T provoca la activación de las células T; (2) suspender la mezcla de células T y las esferas biodegradables en un medio de infusión, con lo que las células T están en estado activado; y (3) envasar la mezcla en un recipiente. Preferiblemente, la mezcla de paquete de la concentración de las células T es de al menos 1×10^7 células por ml de medio de infusión.

[0021] De acuerdo con los métodos de la invención, el recipiente es preferiblemente una jeringa o una bolsa de infusión iv. Más preferiblemente, el recipiente es plegable. El recipiente plegable incluye preferiblemente paredes opuestas de material flexible y un tubo de salida.

Reivindicaciones

- 5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
1. Una composición que comprende una cantidad efectiva de tratamiento de células, de las cuales una parte son células T, donde las células T se han cosechado a partir de cultivo celular y se eliminan de estímulos de activación en el cultivo y las células T cosechadas se formulan para la infusión por un método que comprende (1) poner en contacto las células T con uno o más agentes que ligan un resto de superficie celular sobre al menos una porción de las células T, (2) reticular uno o más agentes con nanoesferas o microesferas biodegradables recubiertas de un medio capaz de reticular uno o más agentes, (3) suspender las células T, uno o más agentes y las nanoesferas o microesferas biodegradables recubiertas en un medio de infusión, y (4) envasar en un recipiente adecuado, en el que las células T están en un estado activado en el medio.
 2. La composición de la reivindicación 1, en la que el medio es adecuado para infusión parenteral.
 3. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el recipiente es plegable.
 4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el recipiente tiene una porción de jeringa.
 5. Un método para preparar una cantidad efectiva de tratamiento de células, de las cuales una parte son células T, en donde las células T se han cosechado de cultivo celular y se eliminan de este modo de estímulos de activación en el cultivo, comprendiendo el método la formulación de las células T para infusión por un método que comprende: (1) marcar las células T cosechadas con uno o más agentes que tienen reactividad para los movimientos superficiales de las células T capaces de suministrar señales de activación tras la reticulación; (2) mezclar las células marcadas con nanoesferas o microesferas biodegradables recubiertas con un material capaz de reticular los agentes unidos a los restos de la superficie de las células T; (3) suspender la mezcla de células T marcadas y esferas de reticulación biodegradables recubiertas en un medio de infusión, con lo que las células T están en estado activado; y (4) envasar la mezcla en un recipiente adecuado.
 6. El método de la reivindicación 5, en el que el recipiente es una jeringa o una bolsa de infusión intravenosa.
 7. El método de la reivindicación 5, en el que el recipiente es colapsable.
 8. El método de la reivindicación 7, en el que el recipiente incluye paredes opuestas de material flexible y un tubo de salida.
 9. Un método para preparar una cantidad efectiva de tratamiento de células, de las cuales una porción son células T, en el que las células T se han cosechado del cultivo celular y se han eliminado de los estímulos de activación en el cultivo, comprendiendo el método la formulación de las células T obtenidas para infusión por un método que comprende: (1) mezclar una población de las células T recogidas con nanoesferas o microesferas biodegradables revestidas con un primer material y uno o más segundos materiales; en el que el primer material reticula los segundos materiales y los segundos materiales tienen reactividad para restos superficiales sobre las células T y en donde la interacción de los segundos materiales con las células T provoca la activación de las células T; (2) suspender la mezcla de células T y las esferas biodegradables en un medio de infusión, con lo que las células T están en estado activado; y (3) envasar la mezcla en un recipiente.
 10. El método de la reivindicación 9, en el que el recipiente es una jeringa o una bolsa de infusión intravenosa.
 11. El método de la reivindicación 9, en el que el recipiente es colapsable.
 12. El método de la reivindicación 11, en el que el recipiente incluye paredes opuestas de material flexible y un tubo de salida.
 13. El método de la reivindicación 9 en el que la mezcla de paquete de la concentración de las células T es de al menos 1×10^7 células por ml de medio de infusión.