

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 648 136**

51 Int. Cl.:

A61K 35/17 (2015.01)

A61K 39/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.05.2012 PCT/US2012/036103**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.11.2012 WO12151266**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2012 E 12779413 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2704741**

54 Título: **Métodos para el manejo de drogas biológicas que contengan células vivientes**

30 Prioridad:

03.05.2011 US 201161481991 P

29.08.2011 US 201161528493 P

30.11.2011 US 201161565225 P

04.01.2012 US 201261582878 P

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

28.12.2017

73 Titular/es:

**IMMUNOVATIVE THERAPIES, LTD. (100.0%)
Malcha Technology Park Building No. 1, First
Floor
96951 Jerusalem, IL**

72 Inventor/es:

HAR-NOY, MICHAEL

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 648 136 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).

Métodos para el manejo de drogas biológicas que contengan células vivientes

Descripción

5 CAMPO

[0001] Esta invención se refiere a métodos para la manipulación de fármacos biológicos que contienen suspensiones de células vivas formuladas en tampón no nutritivo. Más específicamente, la presente invención se refiere al envasado, envío y distribución de suspensiones de células inmunitarias vivas en medios no nutritivos, por lo que las células mantienen sus propiedades únicas de identidad, función y viabilidad.

FONDO

[0002] La terapia celular es una terapia potencialmente curativa contra los tumores, virus y patógenos bacterianos. La terapia celular también se puede usar para tratar enfermedades autoinmunes (por ejemplo, artritis reumatoide, esclerosis múltiple y diabetes tipo I), trastornos neurológicos (como Alzheimer, ELA y enfermedad de Parkinson), así como tratamiento antienvjecimiento, curación de cicatrización y tratamiento de trastornos cardiovasculares. El aprovechamiento del poder del sistema inmune para tratar o prevenir enfermedades es un objetivo principal de la inmunoterapia. Se han desarrollado una variedad de métodos y composiciones de inmunoterapia con el fin de potenciar o suprimir la respuesta inmune en pacientes. Métodos de terapia celular a menudo implican manipulaciones *ex vivo* tales como la proliferación, diferenciación y/o activación de las células. Las células que están más que manipuladas mínimamente son consideradas drogas biológicas por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (USFDA, por sus siglas en inglés), así como las agencias reguladoras en otras jurisdicciones. Antes de que tales medicamentos biológicos puedan comercializarse para el tratamiento o la prevención de cualquier enfermedad, estos productos deben investigarse primero en ensayos clínicos en humanos bajo una Solicitud de Nuevo Medicamento Investigativo (IND) o equivalente.

[0003] Para el uso comercial, los procesos utilizados para la fabricación de fármacos biológicos que contienen células vivas deben estandarizarse de modo que las células resultantes se han pre-determinado de identidad, criterios de liberación funcionales y viabilidad. Los procesos para hacer que la proliferación, diferenciación y/o activación de las células destinadas para su uso como un medicamento biológico generalmente se produce *ex vivo* donde las células se mantienen en medios de cultivo ricos en nutrientes. Sin embargo, antes de administrar las células a humanos, las células deben transferirse a un tampón de infusión no nutritivo. Debido a que estas soluciones tampón no contienen nutrientes, las células permanecen viables solo por cortos períodos de tiempo. Además, incluso si las células permanecen viables después de ser colocadas en un tampón de infusión no nutritivo, pierden rápidamente su identidad única y características funcionales. Perder su identidad única y características funcionales descalifica a las células para ser utilizadas como una droga biológica. Esta limitación requiere que las células destinadas al uso de fármacos biológicos se formulen en el punto de atención o cerca de él. El requisito de que las células se formulen en o cerca del punto de cuidado debido a la vida útil limitada de los productos celulares vivos en la formulación limita severamente la viabilidad comercial de esta clase de producto.

[0004] Las células vivas son relativamente estables en medios de cultivo ricos en nutrientes. Los ejemplos de medios de cultivo ricos en nutrientes incluyen, por ejemplo, X-Vivof 5 (BioWhittaker, Walkersville, MD), RPMI 1640, DMEM, Ham's F12, McCoy's 7A y Medium 199. El medio puede suplementarse con ingredientes adicionales que incluyen suero, proteínas de suero, supresores del crecimiento y sustancias promotoras del crecimiento, tales como anticuerpos monoclonales mitogénicos y agentes selectivos para seleccionar células genéticamente modificadas o modificadas genéticamente. Sin embargo, la transferencia de las células a un tampón no nutritivo tal como se requiere para la administración a un paciente puede conducir a una rápida degradación de la identidad celular, la viabilidad celular y las características funcionales de las células. Los ejemplos de tampones no nutritivos incluyen, por ejemplo, soluciones isotónicas tales como solución salina normal, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa al 5%, Plasma-Lyte (Baxter Scientific, Deerfield, ILO) y Normasol (Abbott Laboratories, Abbott Park, ILO). Además, cuando las células se transfieren a un tampón no nutritivo, generalmente se cree que los reactivos que proporcionan señales de activación y/o diferenciación, así como otros componentes tales como moléculas estimulantes o citocinas, deben eliminarse antes de transferirlos a un tampón no nutritivo. (Véase la patente de Estados Unidos 6.867.041 de Berenson et al.) Por lo tanto, las células en tampón no nutritivo generalmente tienen una vida útil limitada y pueden, por ejemplo, comenzar a perder sus propiedades de identificación y actividad en cuestión de minutos y rara vez mantienen sus características funcionales e identitarias para más de unas pocas horas.

[0005] En la actualidad, las composiciones inmunoterapéuticas que incluyen células vivas se producen generalmente en una instalación de cGMP cerca del punto de cuidado del paciente (véase la publicación de patente no. 2003/0175242 a Gruenberg). La formulación de fármacos biológicos con células vivas debe realizarse bajo condiciones altamente controladas y estériles en instalaciones de cGMP. Las células vivas se manipulan en la instalación de cGMP y se formulan para infusión en un paciente. Una vez que las células se preparan para la infusión, las células se transfieren rápidamente al sitio de atención y se administran al paciente. El mayor inconveniente de este proceso es que las instalaciones de GMP deben estar presentes cerca de cada punto de

atención. Las instalaciones de cGMP requieren un capital monetario considerable para el personal y se ejecutan bajo las reglas y regulaciones requeridas. La necesidad de establecer una multiplicidad de estos centros en o cerca de cada punto de atención tiene un costo prohibitivo y una gran limitación para el potencial comercial de esta clase de medicamentos. Esto lleva a una difícil elección de incurrir en grandes gastos mediante la construcción de un gran número de instalaciones de cGMP con el fin de aumentar el acceso a los pacientes o para proporcionar accesibilidad limitada para los pacientes mediante la construcción de un número limitado de instalaciones de cGMP para minimizar los gastos de capital. Por lo tanto, existe una necesidad en el campo de la terapéutica de células vivas de métodos que permitan que las células en un tampón no nutritivo tengan una vida útil más prolongada. Además, se necesita un método que permitiría el envasado, envío y distribución masiva de productos celulares formulados suspendidos en tampón de infusión que no contiene nutrientes.

[0006] Se describen los problemas con el mantenimiento de la identidad y función de las células usadas en la inmunoterapia adoptiva después de la formulación, por ejemplo, en la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2003/0175272 para Gruenberg. Esta publicación enseña que las células T deben reactivarse justo antes de la administración del paciente (no más de 4 horas antes de la infusión) para mantener las características funcionales de la producción de citoquinas. La función de las células puede mantenerse hasta 48 horas solo si la formulación incluye plasma autólogo. Sin embargo, la recolección de plasma de cada paciente previsto no es propicia para la distribución masiva y la comercialización.

RESUMEN

[0007] En un primer aspecto, esta invención incluye un método in vitro de manejar una composición de fármaco biológica con células vivas para su uso en inmunoterapia, en el que las células vivas activan las células T después de haber sido activadas por restos de la superficie celular de reticulación por anticuerpos monoclonales u otros agentes aglutinantes, comprendiendo el método:

- reactivar las células vivas;
- formular las células vivas en un tampón no nutritivo;
- mantener las células vivas en el tampón no nutritivo a una temperatura de almacenamiento por debajo de aproximadamente 20°C durante más de aproximadamente 6 horas, donde las células vivas mantienen su identidad y al menos una característica funcional que define las células vivas antes de la formulación en el tampón no nutritivo, siendo las células vivas útiles para inmunoterapia después de ser almacenadas durante más de aproximadamente 6 horas en el tampón no nutritivo.

[0008] Las células vivas son útiles para la inmunoterapia después de haber sido almacenadas durante más de aproximadamente 72 horas en el tampón no nutritivo. Preferiblemente, la temperatura de almacenamiento está en un intervalo entre aproximadamente 4°C y aproximadamente 8°C y la concentración de las células en el tampón no nutritivo es de aproximadamente 10^7 células/ml o mayor. Para activar las células T, es preferible usar anticuerpos monoclonales inmovilizados reactivos a las moléculas de la superficie celular. Preferiblemente, las moléculas de la superficie celular son una combinación del primero de los siguientes: CD3, MHC I, MHC II, CD2 y, en segundo lugar, una molécula coestimuladora. Preferiblemente, la molécula coestimuladora es CD28. Las células vivas se colocan en un contenedor o jeringa flexible, en el que el envase o jeringa flexible se envasa en un dispositivo de temperatura controlada que mantiene las células vivas a la temperatura de almacenamiento. El método también incluye el envío y la distribución del paquete en el dispositivo de temperatura controlada al punto de atención.

[0009] En otro aspecto, esta invención incluye un método in vitro de proporcionar una composición de células vivas para su uso en la inmunoterapia a un punto de instalación de cuidado, en el que las células vivas activan las células T después de haber sido activadas por reticulación de restos de la superficie celular por anticuerpos monoclonales u otros agentes aglutinantes, comprendiendo el método:

- reactivar las células vivas;
- formular las células vivas en un tampón no nutritivo en una instalación de procesamiento; y
- transportar las células a un punto de atención en un paquete equipado para mantener una temperatura de almacenamiento por debajo de aproximadamente 20°C, donde las células vivas están a la temperatura de almacenamiento durante más de aproximadamente 6 horas mientras se mantiene su identidad y al menos una característica funcional que definió las células vivas antes de la formulación en el tampón no nutritivo.
- las células vivas están a la temperatura de almacenamiento durante hasta aproximadamente 72 horas mientras que mantienen su identidad y al menos una de las características funcionales de las células vivas útiles en la inmunoterapia.

[0010] Un método para administrar la inmunoterapia a un paciente se describe en el presente documento. El método comprende administrar una composición que incluye células vivas formuladas en tampón no nutritivo, en el que la composición se ha almacenado durante hasta aproximadamente 72 horas en el tampón no nutritivo, en el que las células vivas mantienen su identidad y al menos una de las características funcionales de las células que definieron las células vivas antes de la formulación en el tampón no nutritivo, las células vivas útiles en la inmunoterapia.

[0011] Otro método de administrar la inmunoterapia a la patente se describe en el presente documento. El método comprende administrar una composición que incluye células vivas formuladas en tampón no nutritivo, en el que la composición se almacenó previamente en un estado congelado, por ejemplo en nitrógeno líquido, durante hasta 2 años o más y se ha descongelado y formulado y luego almacenado durante hasta aproximadamente 72 horas en el tampón no nutritivo, en el que las células vivas mantienen su identidad y al menos una de las características funcionales de las células que definieron las células vivas antes de la formulación en el tampón no nutritivo, las células vivas útiles en inmunoterapia.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0012]

Fig. 1A es un gráfico del cambio de temperatura en el contenedor durante el transporte en el que el contenedor no estaba preacondicionado.

Fig. 1B es un gráfico de la temperatura registrada dentro de la caja aislada del aerogel preacondicionado.

Fig. 1C es un gráfico de la temperatura del aire durante el transporte.

Figs. 2A-2C muestran la expresión de CD40L para HTC273, HTC245 y HTC264, respectivamente, las células antes y después del embalaje y envío.

Figs. 3A-3C muestran la viabilidad celular de las células HTC273, HTC245 y HTC264, respectivamente, antes y después del envasado y envío.

Figs. 4A-4C muestran la secreción de IFN- γ de HTC273, HTC245, y HTC264, respectivamente, las células antes y después de embalaje y de envío.

Figs. 5A-5C muestran la secreción de IFN- γ de HTC273, HTC245, y HTC264, respectivamente, las células antes y después de embalaje y envío seguido de incubación a 37°C durante 6 horas.

Las Figuras 6A-6C muestran la expresión de células CD40L de HTC273, HTC264 y HTC245, respectivamente, y se formulan para la administración de ID, IT y IV.

Figs. 7A-7C muestran la viabilidad celular para las células HTC273, HTC264 y HTC245, respectivamente, y se formulan para la administración de ID, IT e IV.

Figs. 8A-8C muestran la secreción de IFN- γ de HTC273, HTC264, y HTC245, respectivamente, células y se formulan para la administración ID, IT y IV.

Figs 9A-9C muestran la expresión de CD40L de HTC273, HTC264, y HTC245, respectivamente, las células formuladas para administración de ID, IT y IV y se almacenan para 24 A ND 48 horas.

Figs. 10A-10C muestran la secreción de IFN- γ de HTC273, HTC264, y HTC245, respectivamente, las células formuladas para administración de ID, IT y IV y se almacenan durante 24 y 48 horas.

Figs. 11A-11C muestran la viabilidad de HTC273, HTC264, y HTC245, respectivamente, las células formuladas para administración ID, IT y IV y almacenadas durante 24 y 48 horas.

Figs. 12A-12C muestran la expresión de CD40L, viabilidad de las células, y IFN por las células HTC264 después de 24, 48 y 72 horas de almacenamiento.

Fig. 12D muestra la secreción de IFN- γ por las células HTC264 Después de 72 horas de almacenamiento y la incubación a 37°C durante 24 horas.

Figs. 13A-13C muestran la expresión de CD40L, viabilidad de las células, y IFN por las células HTC245 después de 24, 48 y 72 horas de almacenamiento.

Fig. 13D muestra la secreción de IFN- γ por las células H TC245 Después de 72 horas de almacenamiento y la incubación a 37°C durante 24 horas.

Figs. 14A-14C muestran la expresión de CD40L, viabilidad de las células, y IFN por las células HTC273 después de 24, 48 y 72 horas de almacenamiento.

Fig. 14D muestra la secreción de IFN- γ por las células HTC273 Después de 72 horas de almacenamiento y la incubación a 37°C durante 24 horas para 3 lotes diferentes de células.

Fig. 15A-15C muestra la expresión de CD40L para CAC y CFB después de 48 horas para HTC245, HTC264 y HTC273, respectivamente.

Fig. 16A-16C muestra la viabilidad celular para CAC y CFB después de 48 horas para HTC245, HTC264 y HTC273, respectivamente.

Fig. 17A-17C muestra la secreción de IFN- γ por CAC y CFB después de 48 horas HTC245, HTC273, y HTC264, respectivamente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS MODALIDADES ILUSTRATIVAS

[0013] Esta invención se refiere al envasado, almacenamiento y distribución de células vivas productos farmacéuticos biológicos formulados en n no tampón nutritivo que pueden exhibir características celulares útiles para la inmunoterapia incluso después de periodos prolongados de tiempo. Estos fármacos biológicos celulares vivos pueden mantener la viabilidad, así como la identidad predeterminada y las características funcionales, incluso después de aproximadamente 72 horas en el tampón no nutritivo.

[0014] En algunos ejemplos de realización, las células inmunes de memoria Th1 utilizados como un producto de fármaco biológico puede mantener la viabilidad, retener la identidad pre-determinada (CD4 +, CD45RO +, CD40L^{hi}, CD62L^{lo}) y recuperar criterios funcionales tales como la secreción de IFN- γ > 1000pg/10⁶ células/4 h. Estas

células de memoria Th1 inmunes pueden exhibir estas características celulares durante al menos aproximadamente 72 horas cuando se formulan en un tampón no nutritivo con microperlas recubiertas con CD3/C28 y se mantienen en un estado refrigerado.

5 **[0015]** Los productos biológicos, que incluyen las células vivas se pueden envasar en condiciones de ambiente controlado para mantener las condiciones de almacenamiento deseadas y enviadas a casi cualquier parte del mundo a puntos de atención mediante un servicio de mensajería urgente (por ejemplo, Federal Express, United Parcel Service (UPS) y mensajería internacional similar). Preferiblemente, el paquete con las células vivas se almacena y se transporta a temperaturas de refrigeración. En el punto de atención, las células formuladas pueden extraerse del paquete y administrarse a un paciente. Las células formuladas permanecen estables después de retirarlas del embalaje refrigerado durante hasta aproximadamente 6 horas. Preferiblemente, las células se retiran primero del envase refrigerado en el punto de atención y se dejan equilibrar a la temperatura ambiente de 1-2 horas antes de la administración del paciente. Las células transportadas son sorprendentemente estables y pueden usarse para métodos similares a las células que no se almacenaron durante largos períodos de tiempo. Alternativamente, las células se almacenan y transportan en un estado congelado a un punto de atención. Las células pueden almacenarse en un estado congelado en un punto de atención y formularse en un sistema estéril cerrado automatizado o semiautomático y luego almacenarse in situ en un estado refrigerado durante hasta aproximadamente 72 horas antes de la administración a un paciente.

20 **[0016]** Las células vivas pueden ser cualquier célula que es más que mínimamente manipulada como ese término es utilizado por la FDA para determinar que el producto celular es un fármaco biológico que requiere una evaluación en los seres humanos sólo en virtud de un nuevo fármaco en investigación (IND) de aplicación o equivalente y fabricado bajo Buenas Prácticas de Fabricación (GMP) de acuerdo con 21 C.F.R. partes 211, 606 y 820 según corresponda.

25 **[0017]** Las células vivas pueden ser de un solo tipo o una mezcla, siempre que se han definido identidad y criterios funcionales. Las células pueden ser naturales o modificadas genéticamente, derivadas de donantes autólogos, alogénicos y/o xenogénicos. Mientras que las células vivas son el ingrediente activo del fármaco biológico, se pueden añadir otras sustancias a las células, tales como proteínas biológicamente activas, péptidos, productos químicos, nucleótidos (ARN, ADN) y/o dispositivos. Las células pueden suspenderse libremente en la formulación o unirse a una superficie o dispositivo o encapsularse en un dispositivo o material. Las células deben estar destinadas a tratar o prevenir la aparición de una enfermedad o condición. Las células se pueden infundir, inyectar o implantar en cualquier ubicación del cuerpo.

35 **[0018]** Por características funcionales, se quiere incluir una variedad de funciones, funciones particularmente inmunes y funciones de diferenciación realizadas por las células y útiles en la inmunoterapia y la terapia con células madre. Estas funciones inmunes pueden incluir, por ejemplo, la secreción de moléculas, la expresión de restos de superficie celular, el reconocimiento de moléculas, la capacidad de responder a moléculas y crecer y/o cambiar a un tipo de célula particular o hacer que otras células del cuerpo crezcan, cambien, mueran o de alguna manera alteren la función normal o de la enfermedad así como otras funciones inmunológicas y de diferenciación celular conocidas en la técnica. Las funciones inmunológicas pueden ser procesos o cascadas de procesos o producción de moléculas que están involucradas en la respuesta innata y/o adaptativa del sistema inmune o la modulación de la respuesta inmune adaptativa o innata. Las funciones pueden estar relacionadas con funciones inmunológicas mediadas por células y/o con el sistema humoral, tanto funciones inmunoestimuladoras como inmunosupresoras. Las características funcionales pueden estar relacionadas con la memoria inmunológica o relacionadas con la distinción entre antígenos propios y no propios, o el reconocimiento de patógenos, tales como bacterias, virus u hongos, así como tumores u otras células o tejidos anormales o no deseados. Otras funciones pueden estar relacionadas con moléculas de superficie que median funciones tales como el tráfico hacia un órgano o tejido o ubicación particular, moléculas de superficie que bloquean, promueven o de otro modo modulan respuestas inmunes o permiten la diferenciación a un tipo de célula particular.

50 **[0019]** Esta divulgación describe productos farmacéuticos biológicos que incluyen células vivas formuladas en tampón no nutritivo como el ingrediente activo. En algunas realizaciones, las células son células inmunes que pueden usarse para inmunoterapia o terapia con células madre. Las composiciones son estables en tampón no nutritivo durante al menos aproximadamente 6 horas a temperatura ambiente y durante al menos aproximadamente 24, preferiblemente al menos aproximadamente 48, y más preferiblemente al menos aproximadamente 72 horas a temperaturas de refrigeración. Sorprendentemente, las células vivas en las composiciones pueden mantener su identidad, viabilidad y características funcionales que exhibieron en medios que contienen nutrientes incluso después de la formulación en un tampón no nutritivo. Las composiciones descritas en este documento se pueden envasar y ventajosamente enviar y distribuir utilizando mensajeros comerciales en contenedores que mantienen las condiciones de almacenamiento apropiadas desde una instalación de procesamiento hasta un punto de cuidado. Tales capacidades pueden dar como resultado ahorros sustanciales de mano de obra, tiempo y dinero en la producción y administración de composiciones terapéuticas que contienen células vivas. Además, la accesibilidad de las composiciones terapéuticas de las células vivas para los pacientes se ve enormemente mejorada ya que una instalación de procesamiento puede producir, envasar y distribuir las células a cualquier punto de atención en el mundo.

[0020] Esta descripción también describe métodos para mantener las suspensiones de células en vivo durante períodos prolongados de tiempo en tampón no nutritivo. Los métodos incluyen transferir las células vivas a un tampón no nutritivo y almacenarlas a una temperatura de almacenamiento más fría. En algunas realizaciones, las composiciones de células vivas se almacenan en condiciones de refrigeración. Cuando se desee, las composiciones se eliminan del almacenamiento y se colocan a temperatura ambiente durante un período de tiempo. En algunas realizaciones, las características funcionales de las células vivas se recuperan sustancialmente después de que las suspensiones de células vivas se hayan colocado a aproximadamente la temperatura ambiente durante un período de tiempo. En otras realizaciones, las características funcionales de las células vivas se recuperan sustancialmente después de que las suspensiones de células vivas se hayan colocado en condiciones fisiológicas durante un período de tiempo.

[0021] Las composiciones terapéuticas descritas en el presente documento incluyen células vivas. Por células vivas, se quiere decir que >70% de las células son viables como se determina por técnicas de ensayo adecuadas, tales como la extrusión de tripano azul, MTT o la detección bioluminiscente de los niveles de ATP tal que las células son capaces de manipulaciones *ex vivo* tales como la expansión, diferenciación y/o activación en condiciones apropiadas. Las composiciones, sin embargo, pueden incluir algunas células inactivadas, células radiadas y/o células no viables. Las células vivas pueden derivarse de varias fuentes que incluyen, por ejemplo, líneas celulares inmortalizadas, cultivos celulares primarios, fluidos biológicos, tejidos, sangre del cordón umbilical, sangre periférica, médula ósea, alícuotas congeladas de células y similares. Las células vivas procedentes de otras fuentes que son capaces de manipulaciones *ex vivo* como se describe anteriormente también están dentro del alcance de la invención.

[0022] Las células en la composición terapéutica pueden ser células alogénicas. Las células derivadas, por ejemplo, de sangre o médula de donantes alogénicos se pueden procesar de una manera deseada y luego formularse para infusión en un paciente. La formulación de infusión colocada en una jeringa o en un paquete de transferencia u otro dispositivo adecuado para contener productos de uso humano puede empaquetarse y enviarse al sitio de atención para la administración del paciente. Alternativamente, las células en la composición terapéutica pueden ser células autólogas que han sido manipuladas, formuladas, empaquetadas y enviadas y deben reinfundirse en el mismo paciente. Las células vivas también pueden derivarse de una fuente no humana y han sido manipuladas, formuladas, empaquetadas y enviadas para administración humana (xenogénica). Las mismas composiciones terapéuticas descritas para la administración humana también pueden usarse en entornos terapéuticos y de prevención de enfermedades no humanas.

[0023] En una realización en las células vivas en las composiciones son células inmunes, estas células inmunitarias pueden incluir células derivadas de médula ósea o sangre del cordón umbilical, granulocitos, tales como neutrófilos, basófilos y eosinófilos. Las células inmunes también pueden ser monocitos, macrófagos, células dendríticas, células asesinas naturales, linfocitos incluyendo células B, células T y células NKT. Las células T pueden ser, por ejemplo, células CD4 + (que incluyen células Th0, Th1, Th2, Th17 y Treg) y/o células CD8 + (Tc1 y Tc2).

[0024] Un método de inmunoterapia para potenciar la respuesta inmune celular en sujetos es un tipo de terapia de células llamado inmunoterapia adoptiva. Una terapia celular es un medicamento cuyo ingrediente activo es, en todo o en parte, una célula viva. La inmunoterapia adoptiva es una terapia celular que implica la eliminación de las células inmunes de un sujeto, el tratamiento *ex vivo* (es decir, activación, purificación y/o expansión de las células) y la posterior infusión de las células resultantes de nuevo en el mismo sujeto (terapia autóloga) o en un sujeto diferente (terapia alogénica).

[0025] El producto de fármaco biológico puede incluir células vivas que han sido manipuladas utilizando una variedad de manipulaciones *ex vivo* para la inmunoterapia adoptiva. Las células vivas que han sido manipuladas *ex vivo* puede incluir, por ejemplo, células LAK (Rosenberg EE.UU. Pat. N° 4.690.915), las células TIL (Rosenberg EE.UU. Pat. N° 5.126.132), las células T citotóxicas (Cai, et al Patente de Estados Unidos. N° 6.255.073, Celis, y col., Patente de Estados Unidos N° 5.846.827), células de ganglios linfáticos que drenan tumores expandidos (Patente de Estados Unidos de Terman N° 6.251.385), diversas preparaciones de linfocitos (Bell, y col., Patente de Estados Unidos N° 6.194.207; Ochoa, y col., Patente de los Estados Unidos N° 5.443.983, Riddell, y col., Patente de los Estados Unidos N° 6.040.180; Babbitt, y col., Patente de los Estados Unidos N° 5.766.920, Bolton, Patente de los Estados Unidos N° 6.204.058), CD8 + TIL (Figlin et al. (1997) Journal of Urology 158: 740), células T CD4 + activadas con anticuerpo monoclonal anti-CD3 en presencia de IL-2 (Nishimura (1992) J. Immunol. 148: 285), células T co-activadas con anti-CD3 y anti-CD28 en presencia de IL-2 (Garlie y otros (1999) Journal of Immunotherapy 22: 336) células T específicas a antígeno CD8 + CTL producidas *ex vivo* y expandidas con anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 (mAb) en presencia de IL-2 (Oelke et al. (2000) Clinical Cancer Research 6: 1997), y la inyección de células tumorales autólogas irradiadas mezcladas con Bacille Calmette-Guerin (BCG) para vacunar a los sujetos seguido siete días después por recuperación de células T de ganglio linfático que se activan con anti-CD3 mAb seguido de expansión en IL-2 (Chang y otros (1997) Journal of Clinical Oncology 15: 796).

[0026] En una realización ejemplar, la composición terapéutica de la presente descripción incluye al menos algunas células T, preferiblemente células T alogénicas. Estas células T también se activan preferiblemente a través de la

activación de la superficie celular para formar células de memoria activadas Th1. Las células T pueden activarse de varias maneras, incluyendo el uso de anticuerpos monoclonales inmovilizados específicos para moléculas de superficie de células T. Las células T activadas adecuadas se describen, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos N° 7.435.592.

5 [0027] Las células tienen preferiblemente restos de la superficie celular que están reticulados por anticuerpos monoclonales u otros agentes de unión. Estos anticuerpos monoclonales y/o agentes de unión preferiblemente se reticulan, por ejemplo, mediante inmovilización en una superficie sólida para activar las células T. Éstas se denominan aquí células activadas en cultivo (CAC). Estas CAC preparadas *ex vivo* se pueden congelar para su uso futuro o se formulan para infusión.

10 [0028] En realizaciones preferidas, las CAC preparadas *ex vivo* se almacenan congeladas hasta que se necesite para administración al paciente. Antes de la administración al paciente, las CAC se descongelan, se lavan y se reactivan en medio nutriente por entrecruzamiento de los restos de unión a la superficie celular tales como CD3 y CD28 como se describe, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos N° 7.402.431. Las CAC, junto con el agente de reticulación, se pueden lavar y transferir a un tampón no nutritivo tal como un tampón de formulación. Las células reactivadas en el tampón de formulación se denominan aquí células en tampón de formulación (CFB). La CFB se puede administrar al paciente con fines terapéuticos. En general, estas células reactivadas, una vez transferidas a un tampón no nutritivo, tienen una vida útil limitada. Las células vivas se pueden formular en una densidad de al menos aproximadamente 10^6 células por ml, preferiblemente a aproximadamente 10^7 células por ml o superior. En algunas realizaciones, las células vivas se pueden formular en una densidad a aproximadamente 10^8 células por ml o superior. La concentración específica de las células puede determinarse mediante el uso específico de las células y el protocolo de terapia.

25 [0029] La composición terapéutica también puede incluir un número de otros componentes. Estos componentes pueden incluir, por ejemplo, agentes que mantienen las células vivas en el estado de activación deseado. En una realización ejemplar, la composición terapéutica puede incluir agentes que mantienen las células T en un estado activado tal como Dynabeads ClinEx-Vivo™ descrito a continuación en los Ejemplos.

30 [0030] La presente invención incluye métodos de almacenamiento y manipulación de las composiciones de células vivas para aumentar la vida útil. La vida útil como se usa en el presente documento se define como la cantidad de tiempo después de la formulación en que el CFB mantiene la viabilidad, la identidad predefinida y las características funcionales. En general, las células se transfieren a un tampón no nutritivo que es apropiado para la infusión en un paciente. Las células pueden estar en una variedad de tampones no nutritivos. El tampón no nutritivo, según se menciona en este documento, es cualquier tipo de medio, tampón u otro líquido que carece de los componentes apropiados para soportar la proliferación y/o expansión celular. Los tampones no nutritivos generalmente son isotónicos, estériles a USP, libres de pirógenos y contienen los componentes apropiados y/o el sistema de tamponamiento para mantener las células vivas intactas y están autorizadas para el uso parenteral en humanos. En una realización ejemplar, el tampón no nutritivo es un tampón de formulación que es Plasmalyte A (Baxter Scientific, Deerfield, IL) con albúmina de suero humano al 1%. (McKesson, San Francisco, California)

45 [0031] En formas de realización con las células activadas, células Th1 particularmente activadas, las señales de activación para las células se mantienen incluso cuando las células se transfieren al tampón no nutritivo. Por ejemplo, en realizaciones en las que las células se activan por entrecruzamiento de los restos de unión a la superficie celular, la reticulación se mantiene preferiblemente en el tampón no nutritivo. El mantenimiento de la reticulación durante el almacenamiento puede ser crítico para restaurar las características funcionales de la composición después de la eliminación del almacenamiento. Las composiciones celulares en las que los componentes activadores se eliminan en un tampón no nutritivo no se recuperan de la misma manera que las células que han mantenido el estado activado.

50 [0032] Los métodos descritos en este documento también incluyen la manipulación de las células vivas después de que las células se transfieren a un tampón no nutritivo. La composición de células vivas puede transferirse a un entorno con una temperatura más baja para el almacenamiento con el fin de aumentar la vida útil de las composiciones. La temperatura más fría a la que se transfieren las células en el tampón no nutritivo se denomina aquí temperatura de almacenamiento. Las células generalmente se transfieren a la temperatura de almacenamiento lo más rápido posible después de colocarlas en el tampón no nutritivo. Las células se transfieren preferiblemente a la temperatura de almacenamiento en menos de aproximadamente seis horas después de colocarlas en un tampón no nutritivo, más preferiblemente en menos de aproximadamente cuatro horas después de colocarlas en un tampón no nutritivo. En realizaciones incluso más preferidas, las células se transfieren a la temperatura de almacenamiento en menos de aproximadamente una hora después de colocarlas en el tampón no nutritivo.

60 [0033] La temperatura de almacenamiento en la que las composiciones pueden sostenerse varía, pero es generalmente por debajo de aproximadamente 20°C. Preferiblemente, las células se almacenan a temperaturas de refrigeración. Las temperaturas de refrigeración pueden estar entre el rango de aproximadamente -2°C y aproximadamente 12°C. Más preferiblemente, las células se almacenan a una temperatura entre más de 0°C y aproximadamente 10°C. Más preferiblemente, las células se almacenan entre aproximadamente 4°C y

aproximadamente 8°C.

[0034] Las composiciones descritas en la presente memoria también pueden ser empaquetadas, enviadas y distribuidas de una instalación de fabricación o elaboración a un punto de sitio de cuidado. Una instalación de fabricación o procesamiento puede ser una instalación como un hospital, clínica o cualquier instalación de producción capaz de manejar células vivas para medicamentos biológicos de conformidad con las pautas establecidas. Un centro de atención puede ser un hospital, una clínica o cualquier otro sitio en el que, por lo general, se le administre atención a un paciente. Las composiciones generalmente se envasan para el envío de una manera que mantiene las composiciones dentro del intervalo de temperatura de almacenamiento indicado anteriormente. Las células se pueden almacenar y enviar en una variedad de contenedores. Las células pueden almacenarse y enviarse, por ejemplo, en un contenedor flexible, una jeringa y similares. Cuando se envía, el contenedor, como una jeringa, se puede colocar en un paquete, como una caja aislada. El paquete o caja es, preferiblemente, preacondicionado a la temperatura de almacenamiento deseada antes del contenedor con las células vivas que se colocan en el paquete. Las composiciones, por ejemplo, pueden envasarse en cajas de hielo o empacadas con aerogel. Los paquetes son preferiblemente cajas aisladas que pueden mantener las temperaturas de almacenamiento deseadas, independientemente de la temperatura externa. Las cajas también se preacondicionan preferiblemente, lo que significa que se han almacenado o ajustado a la temperatura deseada antes del contenedor con las células vivas que se colocan dentro. En realizaciones preferidas, los paquetes se preacondicionan antes de la colocación del producto biológico y los paquetes se transportan en condiciones de refrigeración o congelación al punto de cuidado. Se puede usar cualquier tipo de método de envío, pero en las formas de realización ejemplares el envío se realiza mediante mensajeros comerciales.

[0035] La vida útil de las composiciones descritas en el presente documento puede ser sorprendentemente extendida cuando las composiciones se almacenan dentro de la gama de temperaturas de almacenamiento. La vida útil de las composiciones de células vivas puede extenderse durante más de aproximadamente 6 horas. Preferiblemente, la vida útil de las composiciones de células vivas puede extenderse durante más de aproximadamente 24 horas, y más preferiblemente durante más de aproximadamente 48 horas. En realizaciones aún más preferidas, la vida útil de las composiciones puede extenderse hasta aproximadamente 72 horas. En la realización más preferida, la vida útil puede prolongarse durante hasta aproximadamente 120 horas. Las vidas útiles de más de aproximadamente 120 horas también están dentro del alcance de esta invención.

[0036] Las composiciones celulares en tampón no nutritivo almacenadas de acuerdo con los métodos aquí descritos pueden mantener su viabilidad, la identidad y la función durante el período de almacenamiento y después de la salida del almacén. La viabilidad de las células se puede determinar por una variedad de métodos conocidos en la técnica que incluyen técnicas de ensayo tales como extrusión de azul tripán, MTT, 7-Amino-Actinomicina D o detección bioluminiscente de los niveles de ATP.

[0037] La identidad de las células se puede confirmar mediante una variedad de métodos. Las células pueden ensayarse para una variedad de marcadores de células externas e internas que son indicativos del tipo de célula particular en la composición. Marcadores externos se clasifican por la designación grupo de anticuerpos monoclonales (grupo de diferenciación (CD) designado de talleres 1 al 8 sobre antígenos de diferenciación de leucocitos humanos internacionales con número total de (247) CDs. Los leucocitos expresan distintos surtidos de moléculas en sus superficies celulares, muchos de los cuales reflejan las diferentes etapas de su diferenciación específica del linaje o diferentes estados de activación o inactivación. Las moléculas de la superficie de las células de leucocitos se detectan rutinariamente con anticuerpos monoclonales anti-leucocitos (mAb). Usando diferentes combinaciones de mAbs, es posible trazar los inmunofenotipos de la superficie celular de diferentes subpoblaciones de leucocitos, incluidas las subpoblaciones de linfocitos maduros funcionalmente distintos de las células B, las células T cooperadoras (Th), las células T citotóxicas (Tc) y las células asesinas naturales (NK).

[0038] Incluso después de un almacenamiento en medios no nutritivos, las células vivas en la composición presentan las características funcionales que estaban presentes antes de la formulación en los medios no nutritivos. Las características funcionales pueden incluir una variedad de actividades que incluyen, por ejemplo, la expresión de moléculas funcionales tales como CD40L, FasL, perforina y granzimaB, moléculas coestimuladoras 4-1BBL, CD28, CTLA4 y citocina inducida por activación relacionada con TNF (TRANCE), TWEAK, PD-1, familia B7, moléculas de adhesión tales como las integrinas, las cadherinas y las selectinas y la secreción de una variedad de citocinas y quimioquinas y la expresión de receptores para estas citoquinas y quimioquinas. Las citoquinas y las quimioquinas son proteínas segregadas redundantes con funciones de crecimiento, diferenciación y activación que regulan y determinan la naturaleza de las respuestas inmunes y controlan el tráfico de células inmunes y la disposición celular de los órganos inmunes. Las citoquinas pueden incluir, por ejemplo, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, GMCSF, IFN-gamma y similares.

[0039] En algunas realizaciones, las características funcionales son retenidas después de la formulación y durante el almacenamiento y los niveles de las enzimas o los marcadores pueden someterse a ensayo poco después de la salida del almacén y envío. Por ejemplo, la expresión de CD40L se puede ensayar después de que las composiciones se eliminen del almacenamiento y se dejen incubar a TA durante aproximadamente 2 horas. La expresión de CD40L puede ser similar a los niveles de expresión de CD40L en el momento de la formulación y el

almacenamiento. Véase, por ejemplo, Figs. 2A-2C. De forma similar, se puede determinar el número de células viables en las composiciones después de la eliminación del almacenamiento y la incubación a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas. El número de células viables puede ser similar a los niveles de viabilidad celular en el momento de la formulación y el almacenamiento. Véase, por ejemplo, Figs. 3A-3C.

[0040] En otras realizaciones, las características funcionales se pueden recuperar después de que las células se exponen a condiciones fisiológicas. Esto puede indicar que las composiciones celulares, tras la infusión en un paciente, pueden funcionar según lo previsto y secretar o expresar componentes característicos de las células en el momento de la formulación. La secreción de IFN- γ , por ejemplo, puede ser deprimida cuando las células se formulan y se colocan en almacenamiento. IFN-gamma puede ser denominado aquí IFN- γ o IFN-g. El retorno de las células a temperatura ambiente no restaura la secreción de IFN-g, pero la incubación de las células a 37°C durante 24 horas aumenta la secreción de IFN- γ a niveles similares a los niveles en el momento de la formulación. Véase, por ejemplo, Figs. 12D, 13D y 14D. Ventajosamente, la disminución de los niveles de IFN- γ durante el almacenamiento puede evitar el agotamiento de recursos celulares. Si los recursos celulares para la secreción están suficientemente conservados durante el almacenamiento, a continuación, las células pueden generalmente reiniciar la secreción de IFN- γ en condiciones fisiológicas adecuadas. Así, la administración de la composición a un paciente puede entonces todavía proporcionar al paciente IFN- γ y otras citoquinas inflamatorias derivadas como resultado de la administración de la composición terapéutica, a pesar de que la composición ha sido almacenada durante un período prolongado de tiempo antes a la administración.

[0041] La extensión de la vida útil de las composiciones se puede demostrar en una variedad de maneras. Como se usa en el presente documento, la extensión de la vida útil puede referirse a las células vivas en las composiciones manteniendo su viabilidad, identidad y sus características funcionales incluso después de los tiempos de almacenamiento prolongados descritos anteriormente. Generalmente, después del almacenamiento durante al menos 24 horas, las composiciones mantienen al menos aproximadamente el 50 por ciento de la actividad de una característica definitoria en el tampón no nutritivo con relación a la actividad en el momento de la formulación. Preferiblemente, al menos aproximadamente el 75 por ciento y más preferiblemente, al menos aproximadamente el 85 por ciento e incluso más preferiblemente, al menos aproximadamente el 90 por ciento de la actividad se mantiene después del almacenamiento con respecto a la actividad en el momento de la formulación.

[0042] En realizaciones preferidas, después del almacenamiento durante al menos 48 horas las composiciones mantienen al menos aproximadamente el 50 por ciento de la actividad de una característica que define en tampón no nutritivo con relación a la actividad en el momento de la formulación. Preferiblemente, al menos aproximadamente el 75 por ciento y más preferiblemente, al menos aproximadamente el 85 por ciento e incluso más preferiblemente, al menos aproximadamente el 90 por ciento de la actividad se mantiene después del almacenamiento con respecto a la actividad en el momento de la formulación.

[0043] En realizaciones más preferidas, después del almacenamiento durante al menos 72 horas, las composiciones mantienen al menos aproximadamente el 50 por ciento de la actividad de una característica que define en tampón no nutritivo con relación a la actividad en el momento de la formulación. Preferiblemente, al menos aproximadamente el 75 por ciento y más preferiblemente, al menos aproximadamente el 85 por ciento e incluso más preferiblemente, al menos aproximadamente el 90 por ciento de la actividad se mantiene después del almacenamiento con respecto a la actividad en el momento de la formulación.

[0044] Las composiciones celulares se pueden administrar a un paciente usando una variedad de métodos. Las composiciones se pueden administrar intradérmicamente, intravenosamente, intratecalmente, intratumoralmente y similares.

EJEMPLOS

[0045] Materiales: CD40L conjugado PE se adquirió de Beckman Coulter, Brea, CA. Se adquirió 7-amino-actinomicina D (7-AAD) (1000x) de Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI. PlasmaLyte A se adquirió de Baxter Scientific, Deerfield, IL. La albúmina sérica humana (HSA) se adquirió en McKesson, San Francisco, California. El inhibidor de unión a FcR se adquirió en eBioscience, San Diego, CA. Dynabeads ClinExVivo™ se adquirió en Invitrogen, Carlsbad, CA.

[0046] Preparación de las células en tampón de formulación (CFB) - Células activadas en medios de cultivo (CAC) se colocaron en medios de cRPMI para lavado. Se registró el tiempo para indicar el comienzo del protocolo de formulación. Las células en medio cRPMI se centrifugaron, el sobrenadante se eliminó y las células se resuspendieron en tampón cRPMI. La viabilidad celular se determinó usando ensayos de azul tripan. El número total de células y la concentración de células vivas se usaron para determinar el porcentaje de células viables. Si la muestra tenía una viabilidad celular superior al 80 por ciento, entonces se continuaba el procedimiento para la reactivación y formulación de las células.

[0047] Las células de CAC se resuspendieron a una concentración de 1×10^7 células/ml. La reactivación se realizó a una concentración de células en vivo de 1×10^7 células/ml. La reactivación fue hecha en una placa de 24 pocillos,

placa de 6 pocillos o un matraz de 75 cm³ en función del volumen. Dynabeads ClinExVivo™ CD3/CD28 se añadieron para reactivar las células y se incubó a 36-38°C y 5% de CO₂ durante 4 horas. Después de la incubación durante aproximadamente 4 horas, las células se eliminaron y se transfirieron a un tubo de 50 ml. con tampón de formulación final (FFB). FFB es PlasmaLyte A con 1% de HSA. Las células reactivadas se centrifugaron, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en FFB. Estos se denominan células en tampón de formulación (CFB).

[0048] CFB se resuspendieron en FFB a una concentración de 10⁷ células por ml. El CFB se resuspendió para la administración ID, IT o IV. Se añadió 1 ml de la suspensión celular a una jeringa de 3 ml como una formulación de ID. La formulación IT e IV fueron 3 ml y 5 ml, respectivamente. Las jeringas con las formulaciones apropiadas se almacenaron en refrigeración con una temperatura promedio de aproximadamente 4°C.

[0049] La recolección de muestras después de almacenamiento - Las células y el sobrenadante se recogieron en diferentes puntos de tiempo. Los puntos de tiempo fueron los siguientes: 0 (inicial); 2 horas a temperatura ambiente (TA); 48 horas a 4°C; y 48 horas a 4°C seguido de 2 horas de TA.

[0050] En cada punto de tiempo, se recogieron las suspensiones de células 100 ul y se centrifugaron las células a 400 g durante 5 min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a otro tubo para detección IFN-γ más tarde usando ELISA. Las células se resuspendieron en 150 ul de tampón de tinción para citometría de flujo. En algunos experimentos, las células se resuspendieron en medio 100 ul cRPMI y se cultivaron en la incubadora a 37°C durante 24 h con 5% de CO₂. El sobrenadante se recogió después de 24 h de incubación y la IFN-γ se detectó por ELISA.

[0051] Citometría de flujo (CD40L y 7-AAD) - suspensión de células de 50 ul se transfirió desde arriba (150 ul) en 3 tubos eppendorf, etiquetados como no teñidos, CD40L y 7-AAD, respectivamente. El tubo no teñido se incubó en hielo durante 20 min. Para el tubo CD40L, las células se preincubaron con inhibidor de unión a FcR de acuerdo con las instrucciones del fabricante durante 20 minutos en hielo. A continuación, se añadieron 40 μl de tampón de tinción (PBS + 1% de FBS) y 10 μl de anticuerpo PE-CD40L a la suspensión celular y se incubaron durante 20 min más en hielo en la oscuridad.

[0052] La viabilidad celular se ensayó mediante citometría de flujo de 7-AAD. 7-AAD se intercala en el ADN de las células muertas o dañadas, por lo que la determinación de células 7-AAD positivas es un indicador de la viabilidad celular. Para los tubos 7-AAD, los tubos se centrifugaron a 400 g durante 5 minutos a 6°C. Después de eliminar el sobrenadante, los sedimentos celulares se resuspendieron en 100 μl de solución de 1x7-AAD. El tubo se incubó en hielo durante 15 minutos en la oscuridad. Se añadió 1 ml de tampón de tinción al tubo CD40L y luego los 3 tubos se centrifugaron juntos. Después de descartar el sobrenadante, los sedimentos celulares se resuspendieron en 0,4 ml de tampón de tinción y se realizó FACS.

[0053] IFN-γ ELISA - Las IFN-γ secretadas en el sobrenadante se determinó por kit ELISA sándwich IFN-γ (R & D Systems, Mpls MN.) De acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0054] Ejemplo 1 - Este experimento se hizo para determinar si las células en tampón de formulación (CFB) son estables a bajas temperaturas después del transporte. Los lotes de suspensiones celulares se formularon en FFB y se transportaron a través de un servicio de correo (Federal Express). La temperatura fue monitoreada por un registrador de datos. El cambio de temperatura dentro de una caja que no estaba preacondicionada y una caja con aislamiento de aire comprimido preacondicionada fue monitoreada. La temperatura exterior también fue monitoreada. Tres diferentes lotes fueron formulados y transportados. Se tomaron muestras de sobrenadante de células activadas en medios de cultivo (CAC), CFB inmediatamente después de la formulación, CFB después de 2 horas a temperatura ambiente (TA), CFB después de 48 horas a 4°C y CFB después de 48 horas a 4°C y 2 horas a TA. CAC se ensayó para la expresión de CD40L y las células restantes se analizaron para determinar la expresión de CD40L y la viabilidad de las células.

[0055] La Fig. 1A y Fig. 1B muestra la temperatura que las células se sometieron a durante el transporte. Fig. 1A muestra que la temperatura varió desde aproximadamente 5°C a aproximadamente 13,7°C dentro de aproximadamente 48 horas cuando las muestras no se empaquetan en una caja de preacondicionado. Las muestras eran estables indicando que una fluctuación más amplia de temperatura es aceptable. La Fig. 1B muestra que la temperatura dentro de la caja preacondicionada y aislada permanece bastante estable. Se varió de 0,2°C a 2,2°C. La Fig. 1C muestra la variación de la temperatura exterior durante el período de envío.

[0056] La Fig. 2A-2C muestra que la expresión de CD40L no cambió mucho. La Fig. 3A-3C muestra que la viabilidad celular después del proceso de envío es similar a la viabilidad de las células antes de su envío. Estos resultados indican que el mantenimiento de las composiciones terapéuticas dentro de un amplio rango aproximadamente entre 2°C a aproximadamente 13°C dentro del paquete no era perjudicial.

[0057] Ejemplo 2 - Se realizó este estudio para determinar si la baja temperatura se puede extender a la expiración de CFB. Se realizó la estabilidad de diferentes formulaciones de CFB a TA. CFB se formularon para administración intradérmica (ID), intratumoral (IT) o intravenosa (IV) como se describe anteriormente. La estabilidad de estas formulaciones se ensayó para ver si la estabilidad a baja temperatura puede ser extendida.

[0058] Los lotes HTC264, HTC245 y HTC273 se formularon para ID, IT y IV y se probaron para la expresión de CD40L, la viabilidad celular y la secreción de IFN- γ durante 6 horas a TA después de la formulación. La Fig. 6A-6C, Fig. 7A-7C y Fig. 8A-8C muestran los resultados de estas pruebas. Los tres de estos parámetros son estables después de 6 horas a TA. La Fig. 9A-9C muestra que la expresión de CD40L es estable después del almacenamiento durante 48 horas a 4°C. La Fig. 11A-11C indica que la viabilidad celular es estable después del almacenamiento durante 48 horas a 4°C. La Fig. 10A-10C indica que la secreción IFN- γ se no se recupera así después de 48 horas a 4°C. Sin embargo, como se muestra a continuación, esto se puede recuperar mediante la transferencia a RPMI y la incubación a 37°C durante 24 horas.

[0059] Tres lotes (HTC264, HTC245 y HTC273) se formularon como formulaciones ID, IV o IT. 4 jeringas totales de cada formulación se realizaron (1 para la TA, 1 durante 24 h 4°C, 1 durante 48 h 4°C, 1 durante 72 h 4°C) y se incubaron a 4°C durante diferentes períodos de tiempo. Las muestras se recogieron después de la incubación de nuevo a TA durante 2 horas. Tabla 1 a continuación muestra las horas específicas, muestras y pruebas que se realizaron para cada lote de células. Los niveles IFN- γ también se determinaron cuando las células se incubaron a 37°C durante 24 horas.

TABLA 1

Tiempo	Muestras	Prueba
-4h	CAC	CD40L
0	CFB, el sobrenadante	CD40L, IFN- γ , la viabilidad
2h	CFB, el sobrenadante	CD40L, IFN- γ , la viabilidad
24h 4°C	CFB, el sobrenadante	CD40L, IFN- γ , la viabilidad
24h 4°C-2h TA	CFB, el sobrenadante	CD40L, IFN- γ , la viabilidad
48h 4°C	CFB, el sobrenadante	CD40L, IFN- γ , la viabilidad
48h 4°C-2h TA	CFB, el sobrenadante	CD40L, IFN- γ , la viabilidad
72h 4°C	CFB, el sobrenadante	CD40L, IFN- γ , la viabilidad
72h 4°C-2h TA	CFB, el sobrenadante	CD40L, IFN- γ , la viabilidad

[0060] La Fig. 12A-12D, la Fig. 13A-13D y la Fig. 16A-14D muestran los resultados para los lotes HTC264, HTC245 y HTC273, respectivamente. Formulaciones intradérmicas de estos lotes se ensayaron como se indica. Los resultados mostraron que el mantenimiento de la CFB a 4°C puede mantener la expresión de CD40L en la superficie celular, incluso después de 72 h (Fig. 12A, Fig. 13A y Fig. 16A). La viabilidad de las células no se vio afectada tanto por almacenamiento a baja temperatura (Fig. 12B, Fig. 13B y Fig. 16B). Los niveles de secreción IFN- γ (Fig. 12C, Fig. 13C y Fig. 16C) están deprimidos cuando se devuelven las células a TA por sólo 2 horas. Sin embargo, los niveles IFN- γ se recuperan (Fig. 12D, Fig. 13D y Fig. 14D) cuando las células se transfieren de nuevo a medio RPMI y se incubaron a temperatura fisiológica (37°C) durante 24 horas. Esto indica que las células son todavía capaces de secretar IFN- γ después de mantener la temperatura baja durante 72 horas. Esto sugiere que si estas células se administran terapéuticamente, los IFN- γ se pueden producir en el paciente en niveles similares a las células que no han sido sometidas a un almacenamiento prolongado.

[0061] Ejemplo 3 - Este experimento se realizó para comparar la estabilidad de las células CAC y las células CFB. Tres lotes diferentes de células se formularon como jeringa ID. Una jeringa para CAC y una jeringa para CFB para cada lote. El CAC se descongeló y se lavó con cRPMI. Después del recuento celular, el sedimento celular se resuspendió en 10⁹ células/ml con FFB y 1 ml de suspensión de células se transfirió a una jeringa de 3 ml. Para CFB, el sedimento celular se resuspendió en 10⁹ células/ml con cRPMI y se mezcla con las perlas anti-CD3/anti-CD28. La mezcla de células y de perlas se incubaron durante 4 horas a 37°C con 5% de CO₂. Las células se lavaron con FFB y se resuspendieron en 10⁷ células/ml con FFB. La suspensión celular se transfirió a una jeringa de 3 ml. En cada punto de tiempo, las muestras de 100 ul se obtuvieron de la jeringa para CD40L, IFN- γ , pruebas de viabilidad. Después de incubación a 4°C durante 48 horas, algunas muestras se centrifugaron a 400 g durante 5 min. para eliminar el FFB. Después de desechar el sobrenadante, el sedimento celular se resuspendió en 100 ul cRPMI y se incubó a 37°C con 5% de CO₂ durante 2 horas. El sobrenadante se recogió para la detección de IFN- γ . La Tabla 2 a continuación enumera las muestras que se recogieron y las pruebas que se realizaron.

TABLA 2

Tiempo	Muestras	Prueba
0	CAC, el sobrenadante	CD40L, IFN- γ , la viabilidad
2h, TA	CAC, el sobrenadante	CD40L, IFN- γ , la viabilidad
48 h, 4°C	CAC, el sobrenadante	CD40L, IFN- γ , la viabilidad
48h 4°C-2H TA	CAC, el sobrenadante	CD40L, IFN- γ , la viabilidad
0	CFB, el sobrenadante	CD40L, IFN- γ , la viabilidad
2h, TA	CFB, el sobrenadante	CD40L, IFN- γ , la viabilidad
48 h, 4°C	CFB, el sobrenadante	CD40L, IFN- γ , la viabilidad
48 h, 4°C-2H TA	CFB, el sobrenadante	CD40L, IFN- γ , la viabilidad

[0062] Los resultados indicaron que la incubación de CAC para 4°C durante 48 horas disminuyó la expresión de CD40L en la superficie celular. Véase significativamente Fig. 15A-15C. Sin embargo, la incubación de CFB a 4°C durante 48 horas podría mantener la expresión CD40L lo que sugiere que la reticulación de CD3 y CD28 son esenciales para la estabilidad de las células. CFB son capaces de mantener la viabilidad y secretar grandes cantidades de IFN- γ , incluso después de la incubación durante 48 horas a 4°C. Véase Figs. 16A-C y Figs. 17A-C.

[0063] Ejemplo 4 - Este estudio se realizó para determinar la estabilidad de CFB formulado después del envasado y envío desde una planta de producción en Jerusalén, Israel a un punto de cuidado. Es fundamental confirmar que el producto CFB siga cumpliendo identidad preestablecida y características funcionales después de 72 horas en tránsito, ya que al final del proceso de formulación, las células se transfieren a un tampón de infusión no de nutrientes, en el que las células pueden perder su viabilidad y la identidad única y características funcionales. Se sabe que las bajas temperaturas pueden retrasar la expresión génica y la actividad de las células y que esta expresión génica puede ser restaurada mediante la devolución de las células de nuevo a temperatura fisiológica. Por esta razón, el envío se realiza utilizando recipientes previamente validados, refrigerados, de temperatura controlada.

[0064] Se ensayaron las células CFB para comprobar si su identidad predefinida y características funcionales se mantienen después de 72 horas en tránsito, mediante la comparación de las características de las células de tránsito anterior (en línea de base - jeringas formuladas después de la activación 4h = FF) a las obtenidas después del envío a NY y de vuelta, como mínimo 72 horas después de FF terminada.

[0065] Los parámetros de punto final predefinidos fueron:

1. Prueba de viabilidad: La viabilidad CFB debe ser >70% de células vivas en todos los puntos de tiempo probados.

2. Prueba de endotoxina rápida: los niveles de endotoxina de muestra recogida al inicio y después de 72 horas a 4°C debe ser <0,5Eu/ml.

3. Tinción de Gram: no se debe observar bacterias en las muestras recogidas en todos los puntos de tiempo ensayados.

4. Tinción de superficie - CD40L AM (CFB-CAC) \geq 30:

5. Esterilidad USP: no hay crecimiento de la muestra formulada en todos los medios ensayados.

6. Secreción IFN γ probada por ELISA:

6.1 IFN γ acumulado durante la activación de 4 horas >1000pg IFN γ por 1×10^6

6.2 IFN γ acumulado durante 24 horas después de línea de base >6,000pg por 1×10^6 cel ls

6.3 IFN γ acumulado durante 24 horas después de 72 horas a 2°C - 8°C >6,000pg por 1×10^6 células

Resultados:

[0066] 3 procesos de formulación final separados se realizaron en dosis de lote HTC300.

[0067] El producto formulado, envasado en jeringas, fue enviado con Flying Cargo (FC) a NY, y de nuevo a Jerusalén Israel.

[0068] Las jeringas en tránsito se mantuvieron a 2-8°C, a partir de la hora final de formulación hasta 72 horas como se demostró por el registrador de temperatura dentro del paquete de envío. Todos los resultados se resumen en la Tabla 3.

TABLA 3

Nº de Formulación	Tipo de célula/Tiempo	Viabilidad celular	CD4 0L AM CFB-CAC	IFN γ (pg/10 ⁶ células)	Endotoxina (EU/ml)	Tinción de Gram	Esterilidad	Positivo/Negativo
HTC300 T7-71 +72	CAC	97,95%						Positivo
	Línea de base CFB	90,91%	143,60	8.027	<0,2	Positivo	Positivo	
	Tras 24 horas a 37°C en cRPMI			45.741				
	tras 72h a 4°C	90,24%	192,02		<0,277	Positivo		
	Tras 24 horas a 37°C en cRPMI			28.955				
HTC300 T7-73 +74	CAC	99,40%						Positivo
	Línea de base CFB	98,23%	117,64	6.215	<0,219	Positivo	Positivo	
	Tras 24 horas a 37°C en cRPMI			31.155				
	tras 72h a 4°C	95,65%	166,52		<0,208	Positivo		
	Tras 24 horas a 37°C en cRPMI			13.284				
HTC300 T7-77 +78	CAC	98,45%						Positivo
	Línea de base CFB	97,61%	165,39	8.960	<0,208	Positivo	Positivo	
	Tras 24 horas a 37°C en cRPMI			42.520				
	tras 72h a 4°C	92,81%	231,50		<0,2	Positivo		
	Tras 24 horas a 37°C en cRPMI			22.583				

[0069] Como se puede apreciar en la Tabla 3, los tres lotes formulados pasaron todos los criterios de aceptación predefinidos, demostrando por lo tanto la estabilidad de CFB en condiciones de distribución recomendadas.

[0070] Aunque la presente invención ha sido descrita con referencia a realizaciones preferidas, trabajadores expertos en la técnica reconocerán que pueden hacerse cambios en forma y detalle sin apartarse del alcance de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Reivindicaciones

- 5 **1.** Un método in vitro de manejar una composición de fármaco biológica con células vivas para su uso en inmunoterapia, en el que las células vivas activan las células T que han sido activadas por restos de la superficie celular de reticulación por anticuerpos monoclonales u otros agentes de unión, comprendiendo el procedimiento:
- 10 la reactivación de las células vivas;
la formulación de las células vivas en un tampón no nutritivo;
el mantenimiento de las células vivas en el tampón no nutritivo a una temperatura de almacenamiento por debajo de aproximadamente 20°C durante más de aproximadamente 6 horas,
en el que las células vivas mantienen su identidad y al menos una característica funcional que define las células vivas antes de la formulación en el tampón no nutritivo, las células vivas que son útiles para la inmunoterapia después de haber sido almacenada durante más de aproximadamente 6 horas en el tampón no nutritivo.
- 15 **2.** El método de la reivindicación 1 en el que la temperatura de almacenamiento está en un intervalo entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 10°C.
- 3.** El método de la reivindicación 1 en el que la concentración de las células en el tampón no nutritivo es de aproximadamente 10⁶ células/ml o mayor y/o las células vivas se colocan en un recipiente o una jeringa flexibles, en el que el recipiente flexible o jeringa se envasa en un dispositivo controlado por temperatura que mantiene las células vivas a la temperatura de almacenamiento.
- 20 **4.** El método de la reivindicación 1 en el que las células vivas son células Th1 activadas por anticuerpos monoclonales inmovilizados que son reticulados o las células Th1 son activadas por anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 inmovilizados.
- 25 **5.** El método de la reivindicación 1 en el que las células vivas expresan CD40L, FasL, perforina y granzima B, expresan moléculas coestimuladoras, expresan moléculas de adhesión, secretan citocinas, quimiocinas o combinaciones de las mismas.
- 30 **6.** El método de la reivindicación 1 en el que las células vivas en la composición expresan CD40L después de almacenamiento en una cantidad de al menos aproximadamente 80% con respecto a la expresión de CD40L en el momento de la formulación.
- 35 **7.** El método de la reivindicación 5 donde la citoquina inflamatoria secretada es IFN-γ y el nivel de secreción está en una cantidad de al menos aproximadamente 80% en comparación con los niveles en el momento de la formulación.
- 8.** El método de la reivindicación 7 en el que la secreción de IFN-γ después de almacenamiento se recupera después de incubación a 37°C durante al menos 24 horas.
- 40 **9.** El método de la reivindicación 1 en el que las células vivas en el tampón no nutritivo son estables durante al menos aproximadamente 72 horas.
- 45 **10.** Un método in vitro de proporcionar una composición de células vivas para su uso en la inmunoterapia a un punto de instalación de cuidado, en el que las células vivas activan las células T que han sido activadas por reticulación de restos de la superficie celular por anticuerpos monoclonales u otros agentes de unión, comprendiendo el método :
- 50 la reactivación de las células vivas;
la formulación de las células vivas en un tampón no nutritivo en una instalación de procesamiento; y
el transporte de las células a un punto de instalación de atención en un paquete equipados para mantener una temperatura de almacenamiento por debajo de aproximadamente 20°C, en el que las células vivas están a la temperatura de almacenamiento durante más de aproximadamente 6 horas mientras que se mantiene su identidad y al menos una característica funcional que define las células vivas antes de la formulación en el tampón no nutritivo.
- 55 **11.** El método de la reivindicación 10 que comprende además la colocación de las células formuladas en un recipiente flexible o jeringa antes del transporte.
- 60 **12.** El método de la reivindicación 10 en el que las células vivas son células Th1 activadas por anticuerpos monoclonales inmovilizados, en los que los anticuerpos monoclonales están reticulados.
- 13.** El método de la reivindicación 10 en el que las células vivas en la composición expresan CD40L tras el transporte y la eliminación de la temperatura de almacenamiento en una cantidad de al menos aproximadamente 80% con respecto a la expresión de CD40L en el momento de la formulación.
- 65 **14.** El método de la reivindicación 10 en el que las células en la composición secretan IFN-γ después del transporte

y la eliminación de la temperatura de almacenamiento en una cantidad de al menos aproximadamente 80% en comparación con los niveles en el momento de la formulación.

5 **15.** El método de la reivindicación 14 en el que la secreción de IFN- γ después del transporte y almacenamiento se recuperó después de la incubación a 37°C durante al menos 24 horas.

16. El método de la reivindicación 10 en el que las células vivas en el tampón no nutritivo están a la temperatura de almacenamiento para al menos aproximadamente 72 horas.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

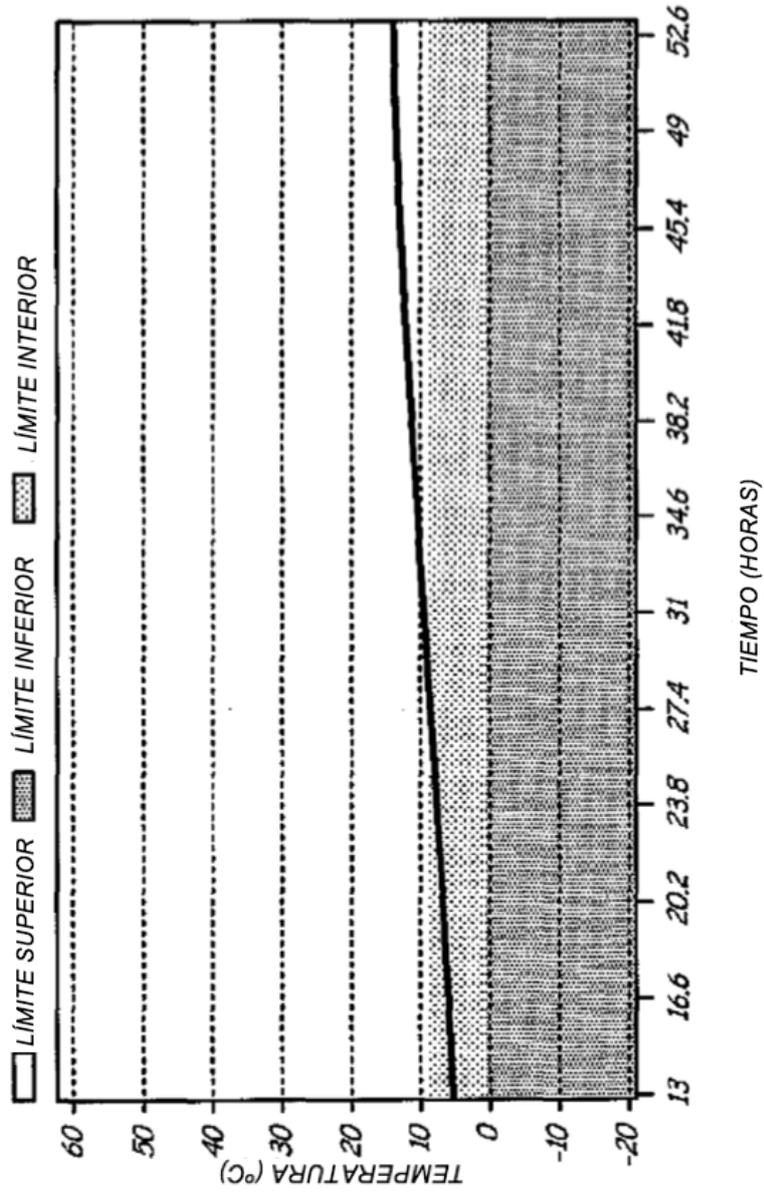


Fig. 1A

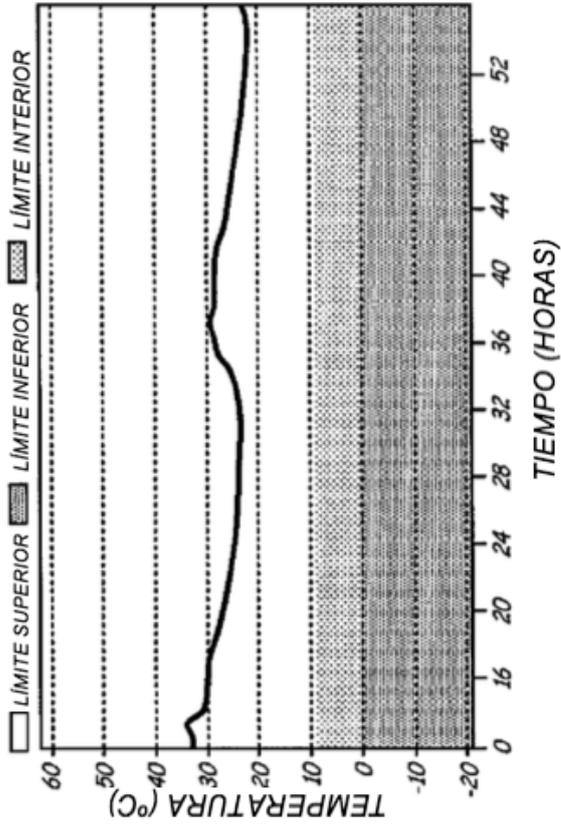


Fig. 1C

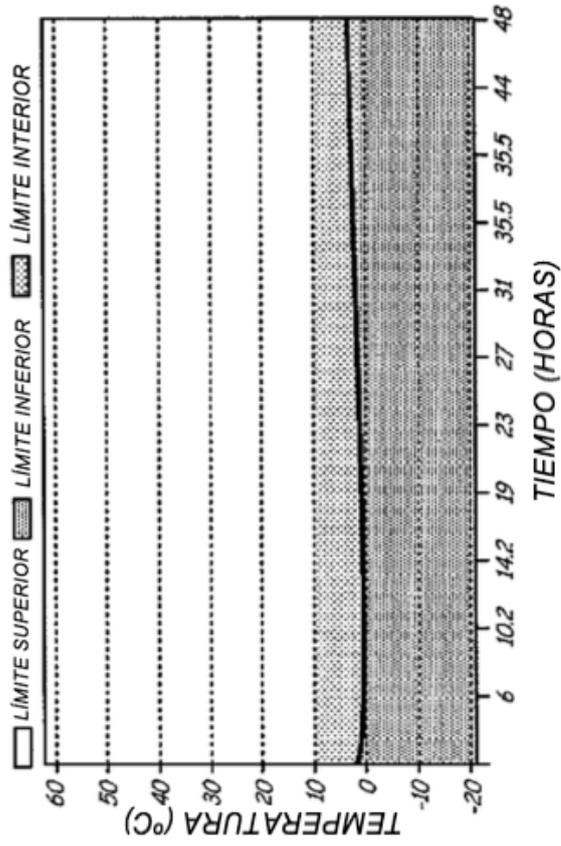


Fig. 1B

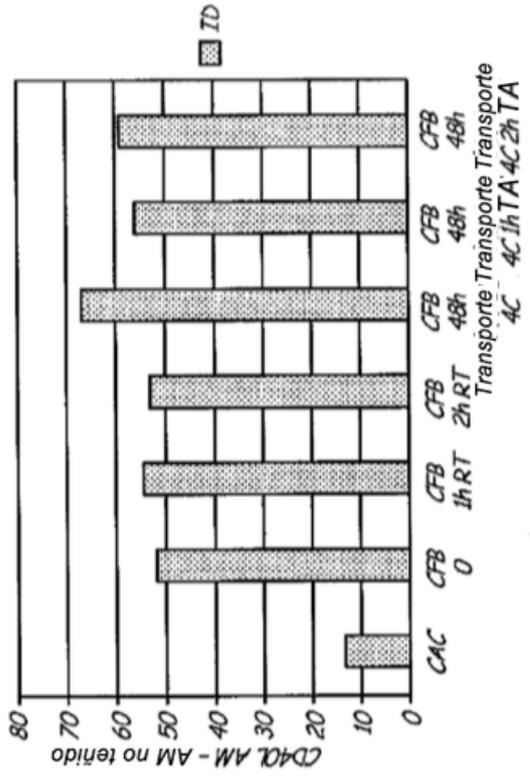


Fig. 2A

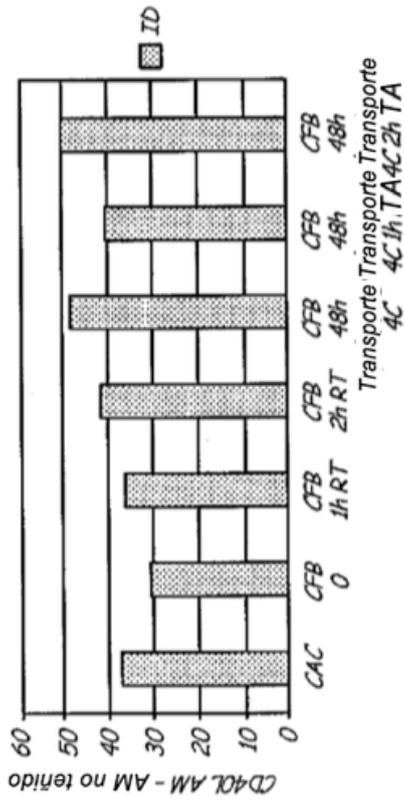


Fig. 2B

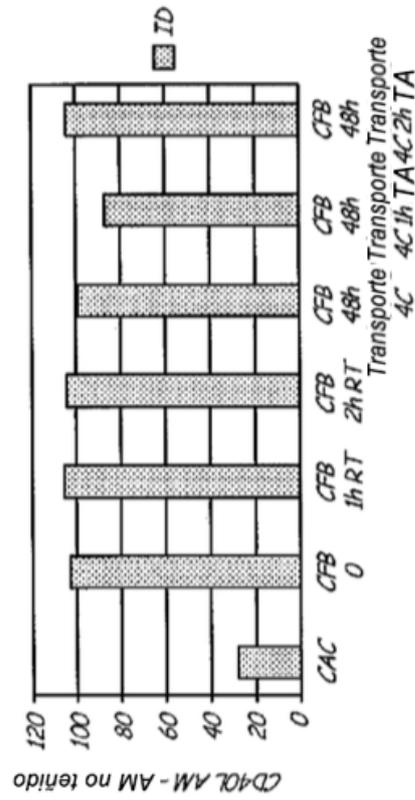


Fig. 2C

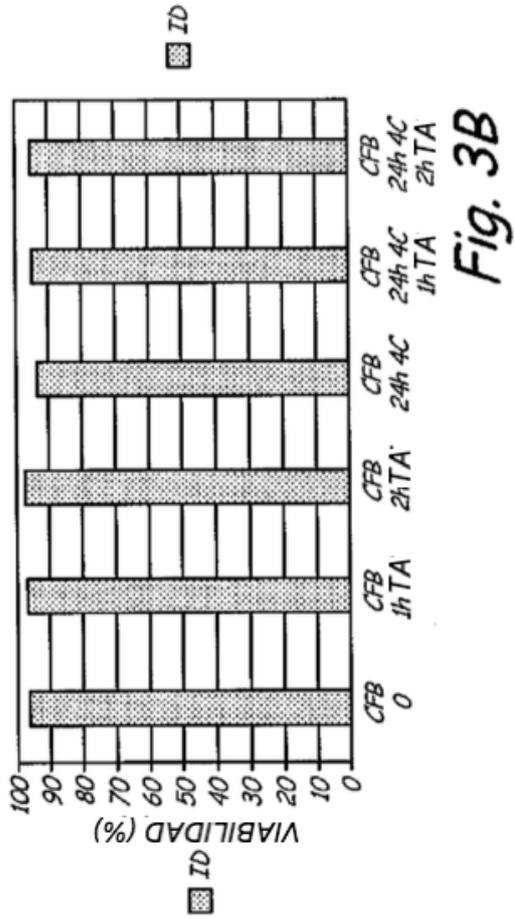


Fig. 3A

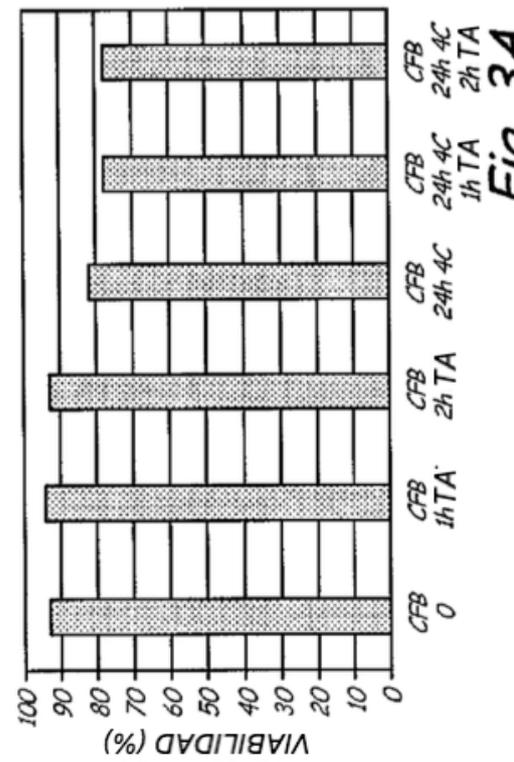


Fig. 3B

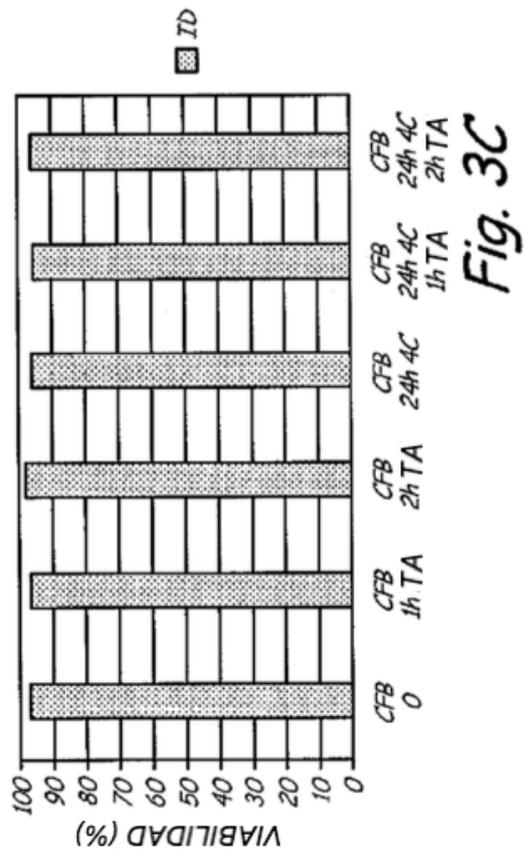
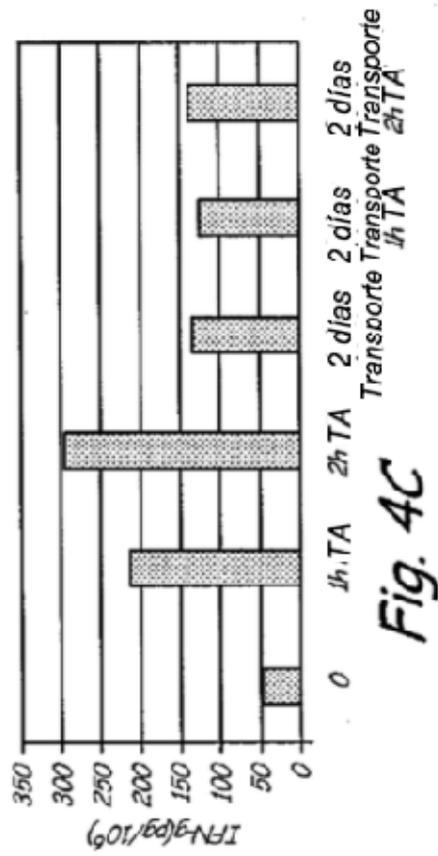
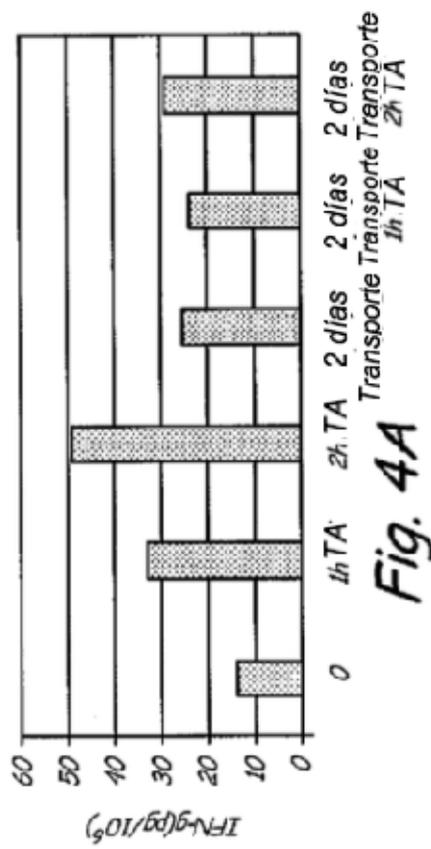
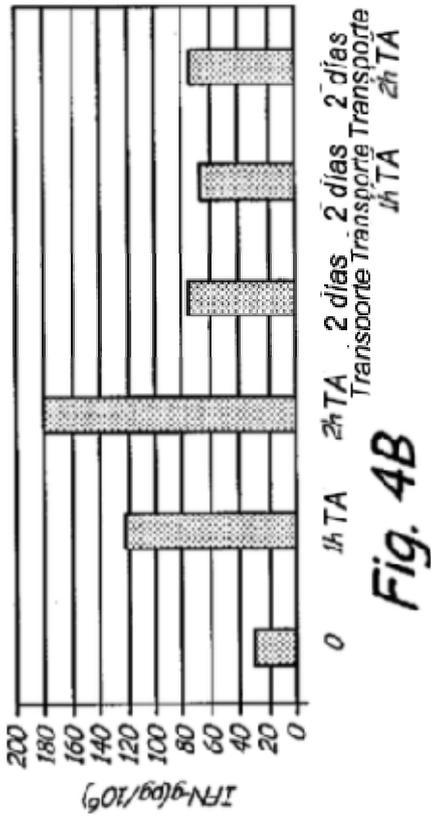
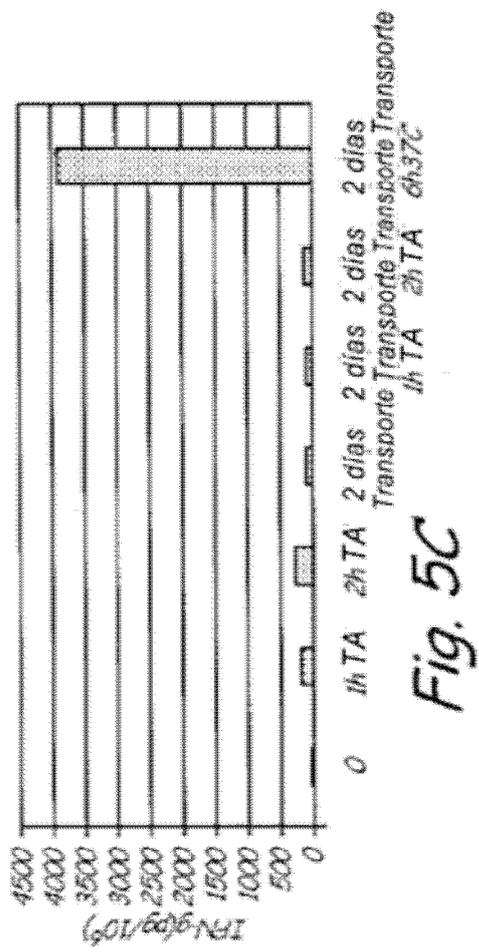
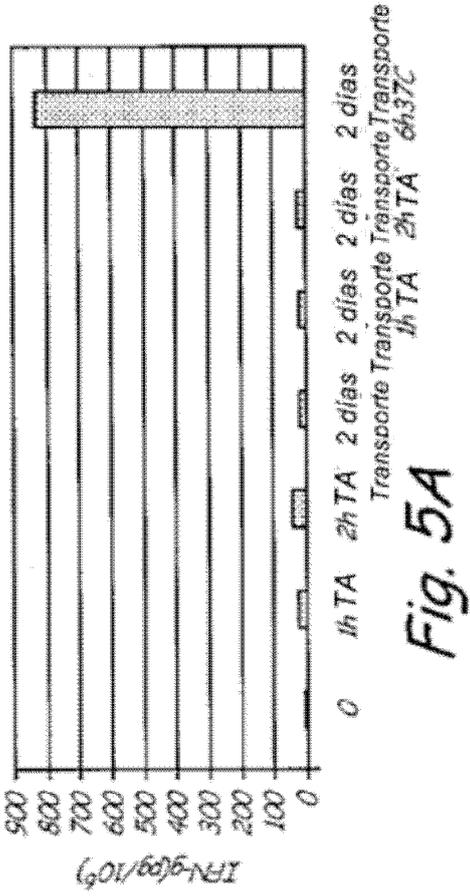
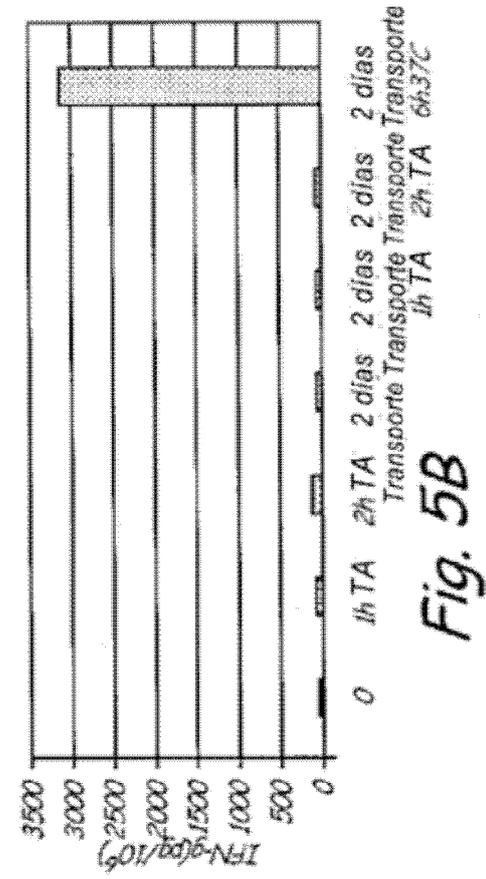


Fig. 3C





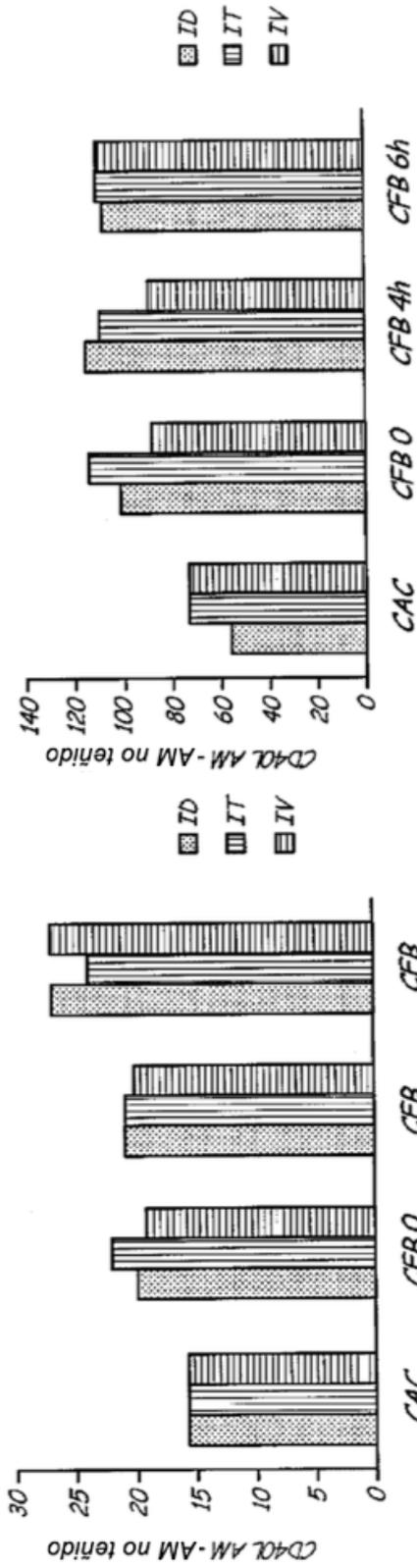


Fig. 6A

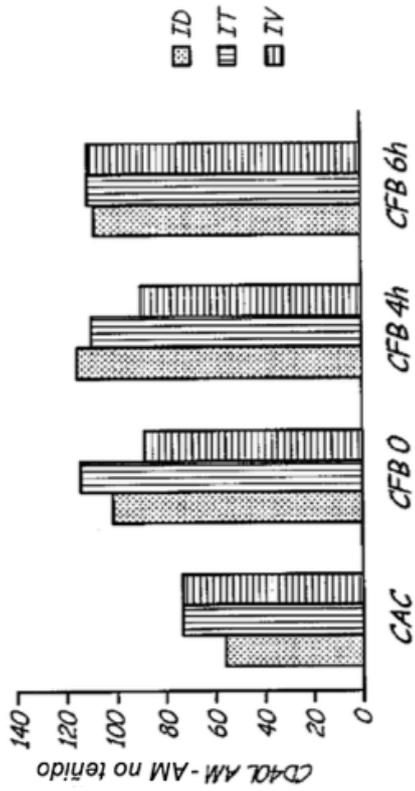


Fig. 6B

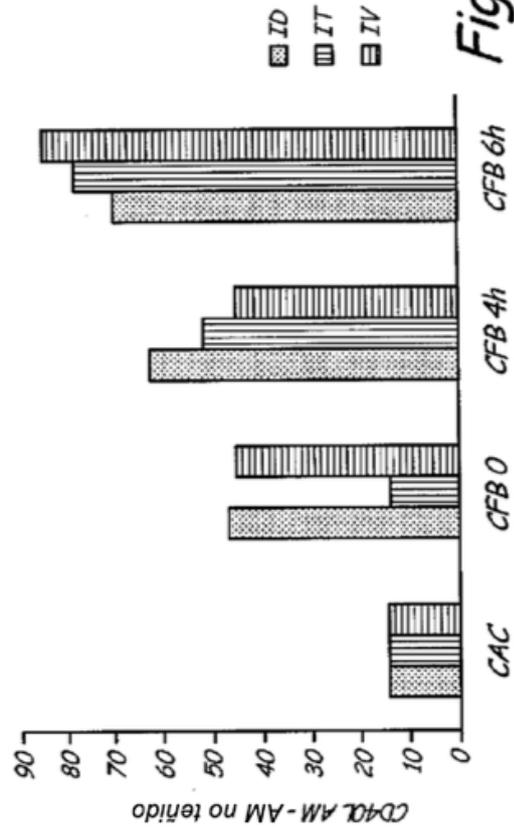
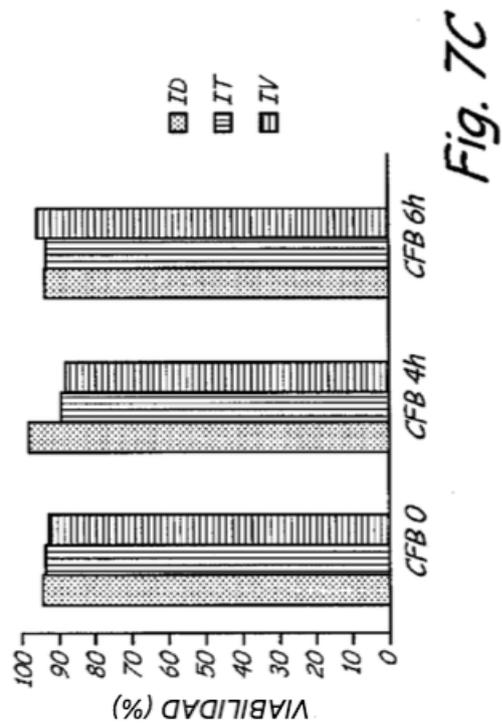
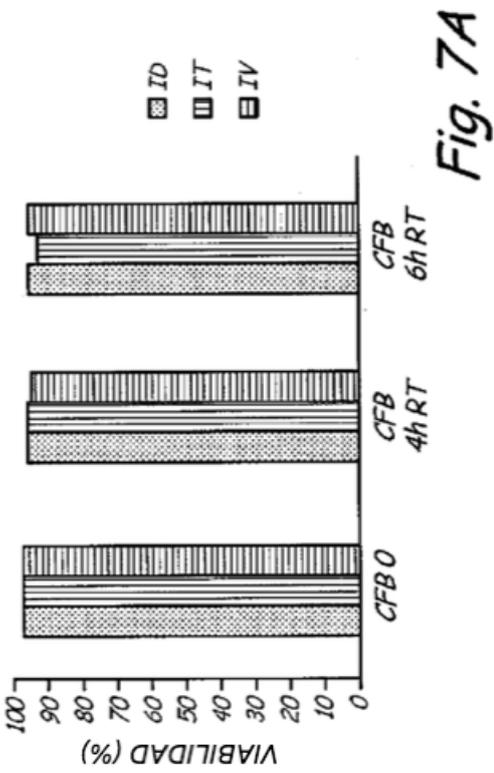
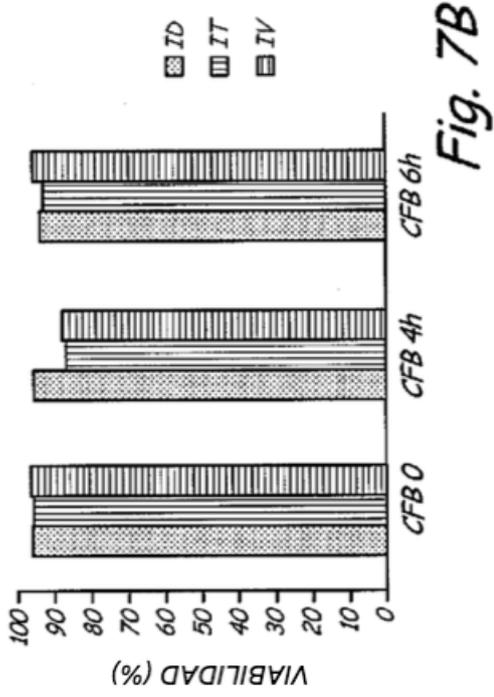


Fig. 6C



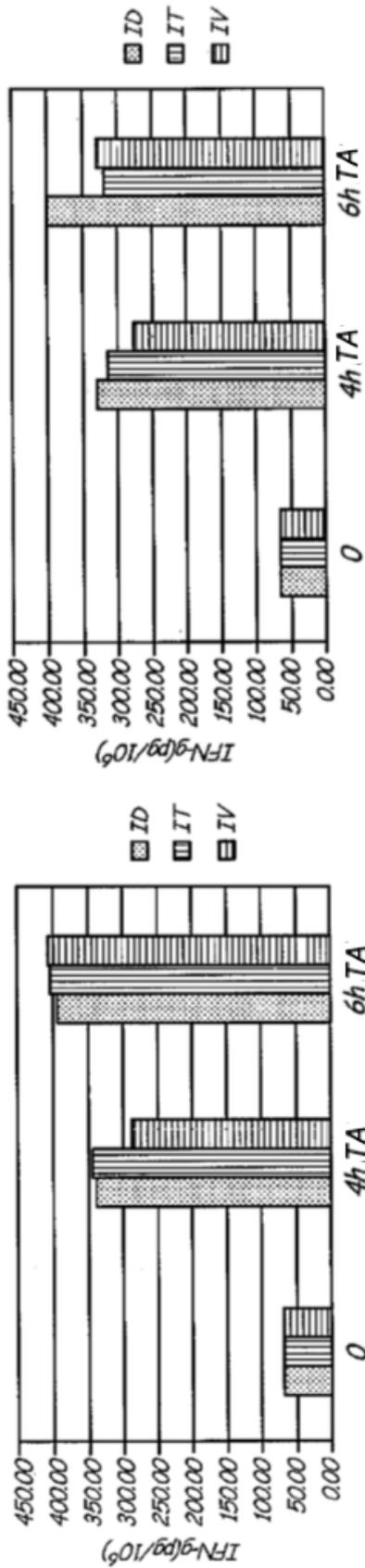


Fig. 8A

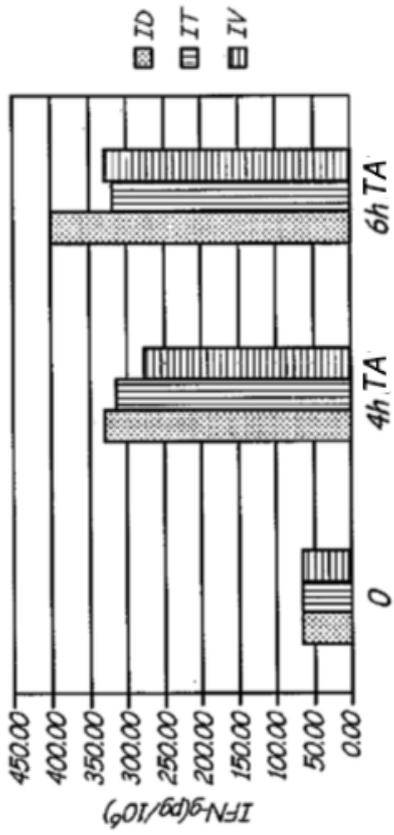


Fig. 8B

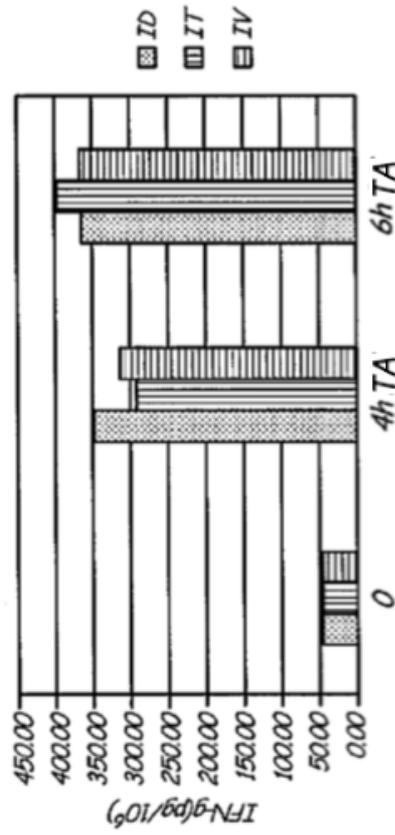


Fig. 8C

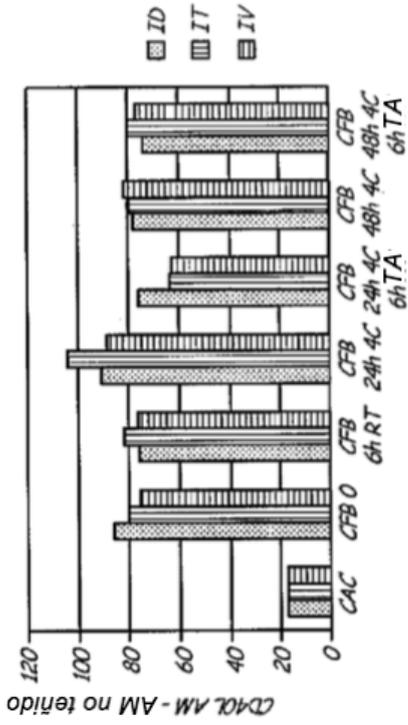


Fig. 9A

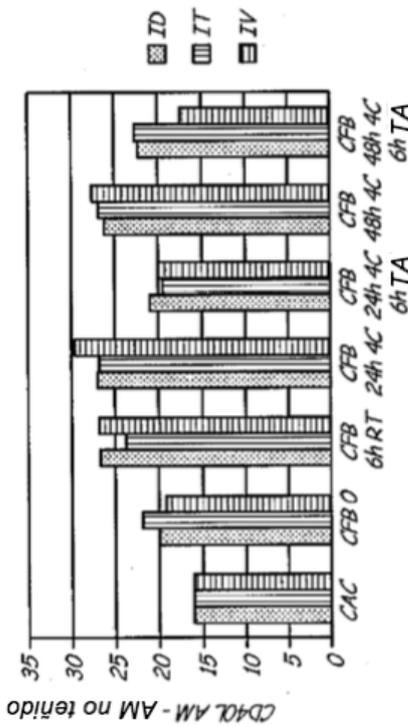


Fig. 9B

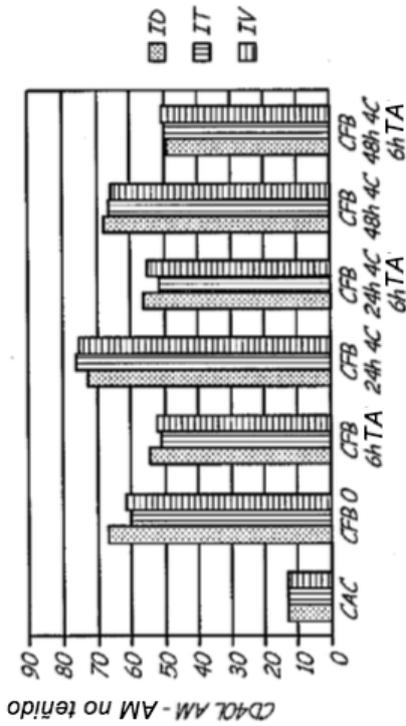


Fig. 9C

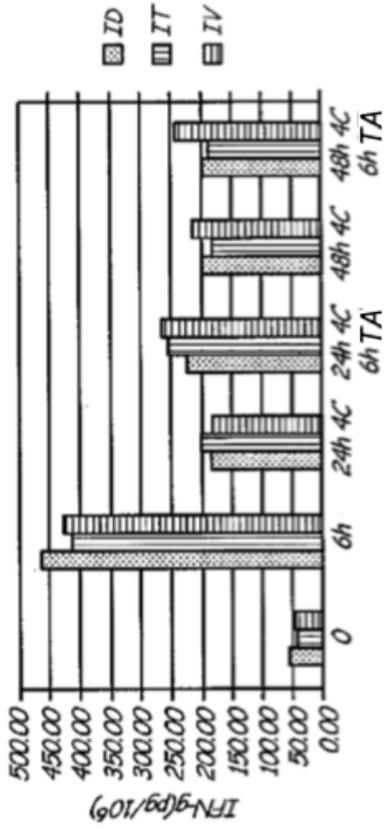


Fig. 10B

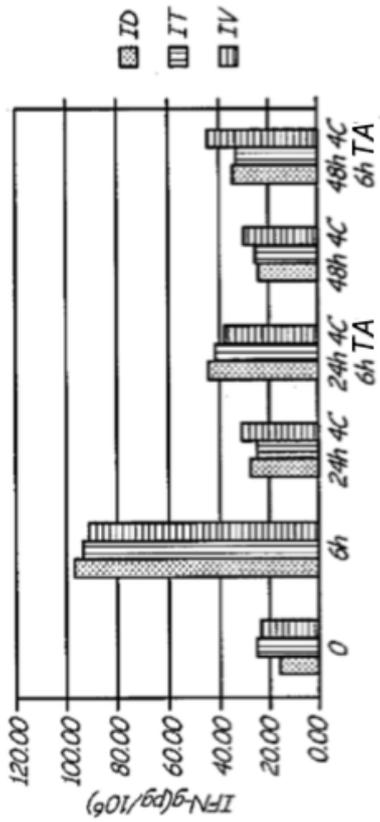


Fig. 10A

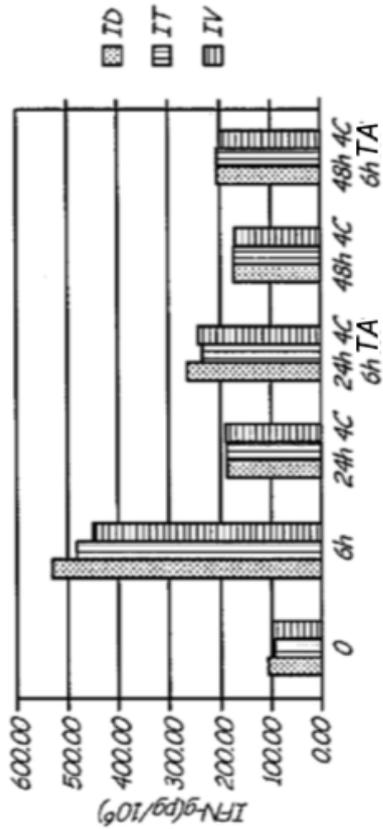


Fig. 10C

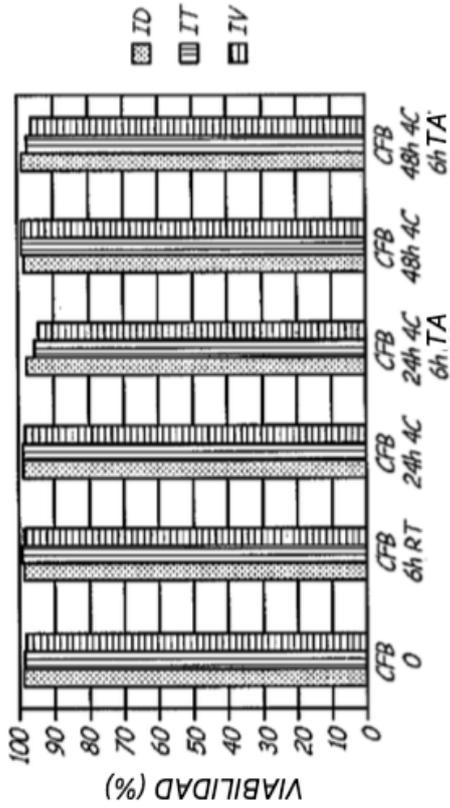


Fig. 11B

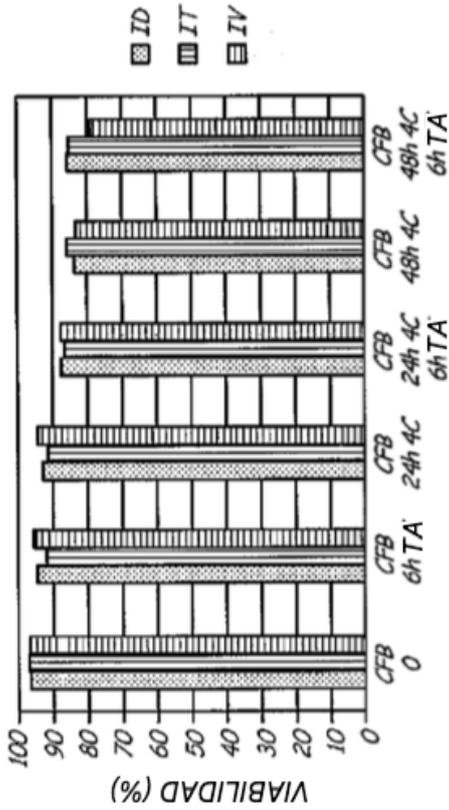


Fig. 11A

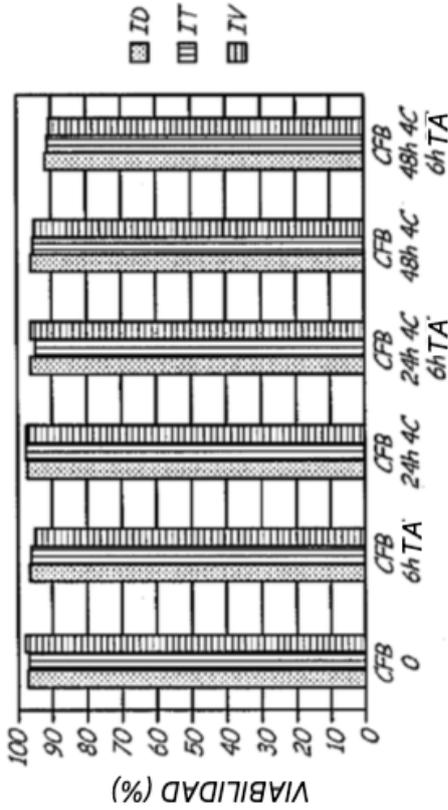


Fig. 11C

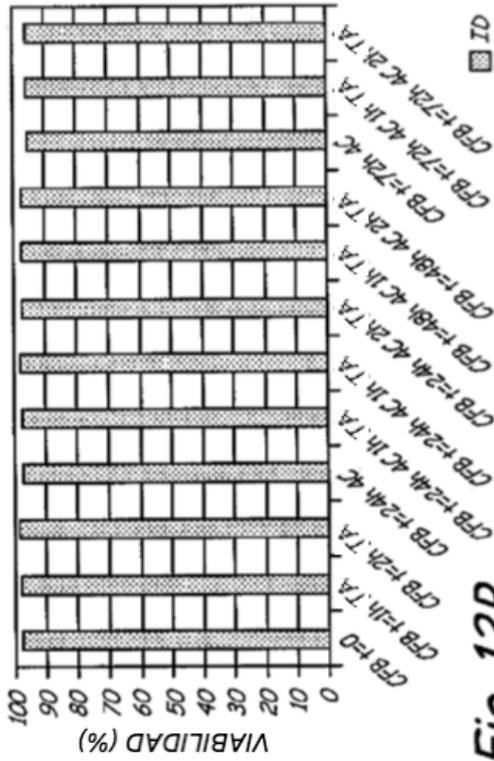


Fig. 12A

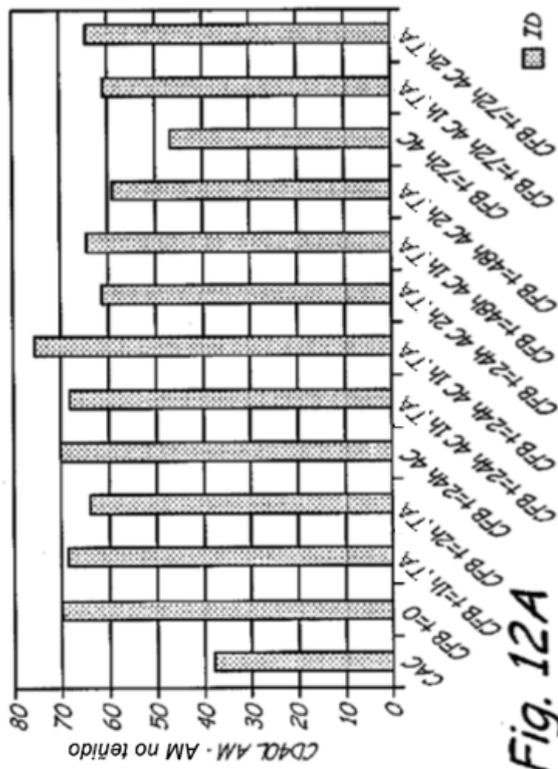


Fig. 12B

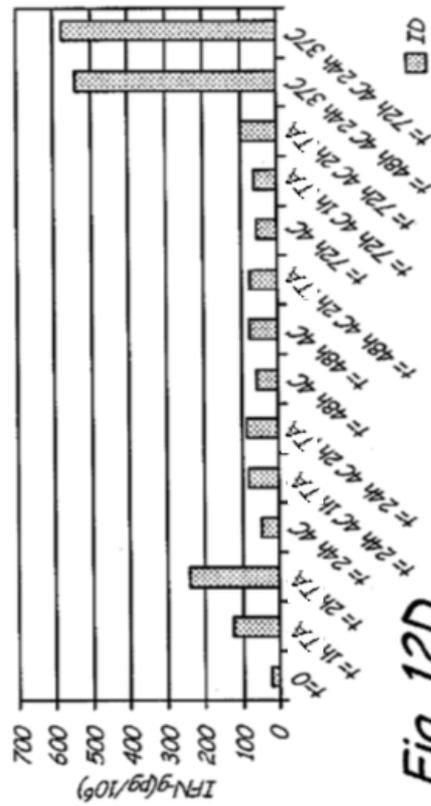


Fig. 12C

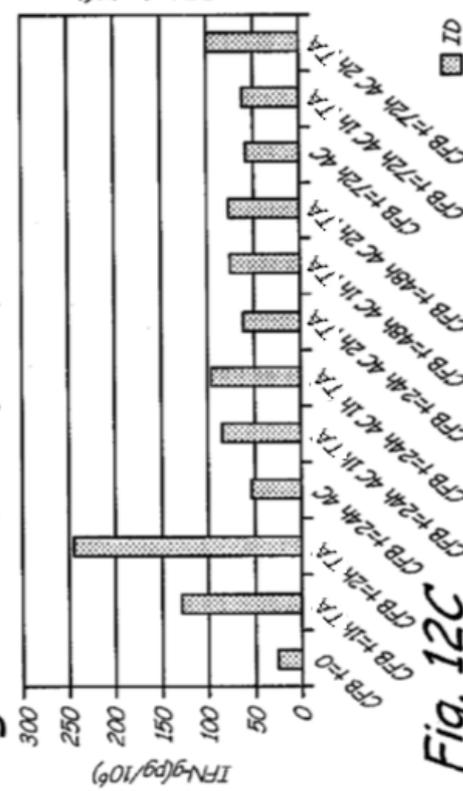


Fig. 12D

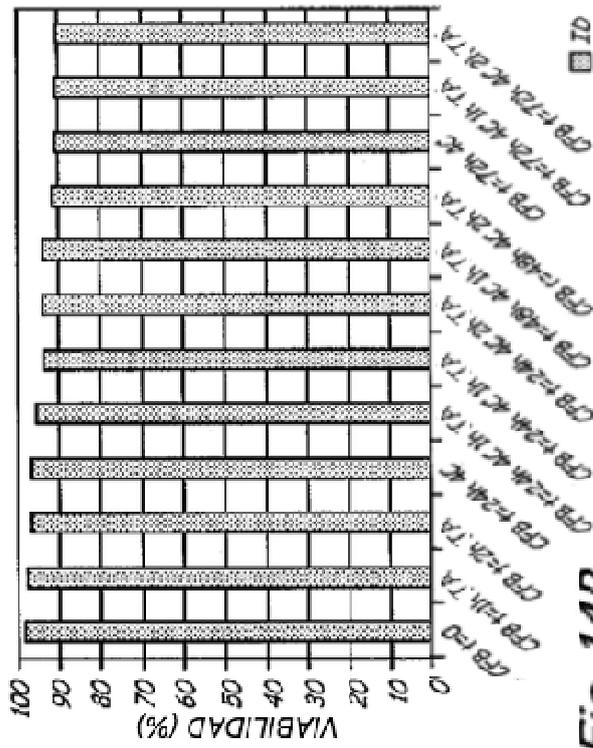


Fig. 14B

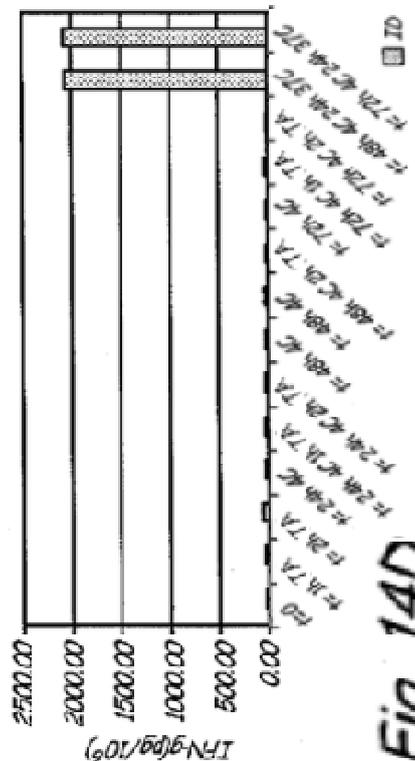


Fig. 14D

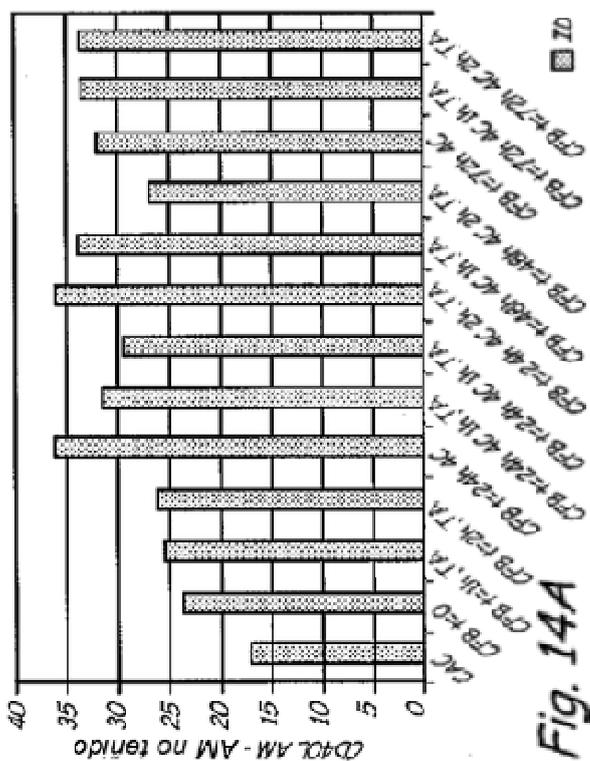


Fig. 14A

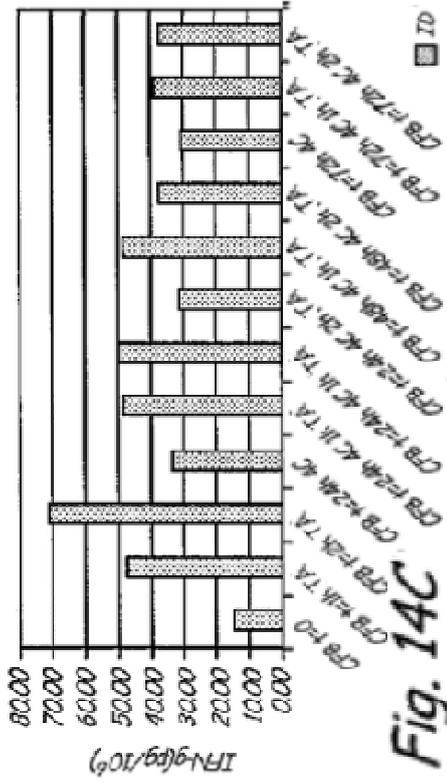


Fig. 14C

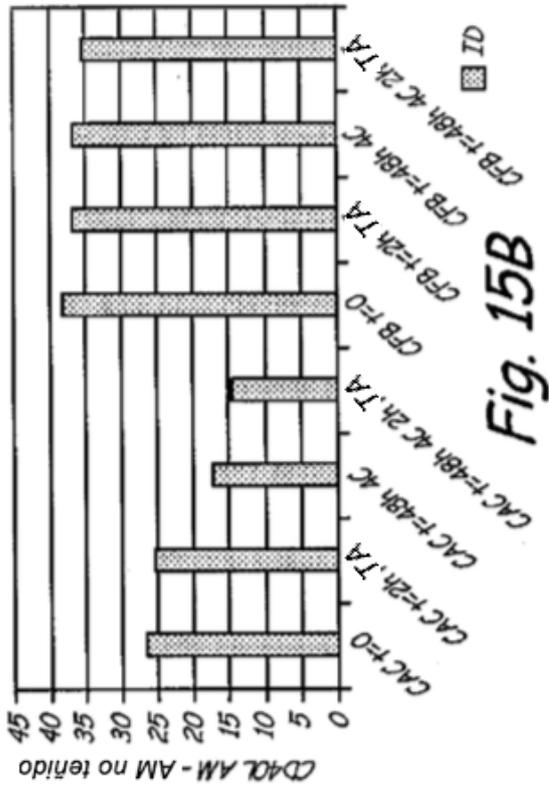


Fig. 15B

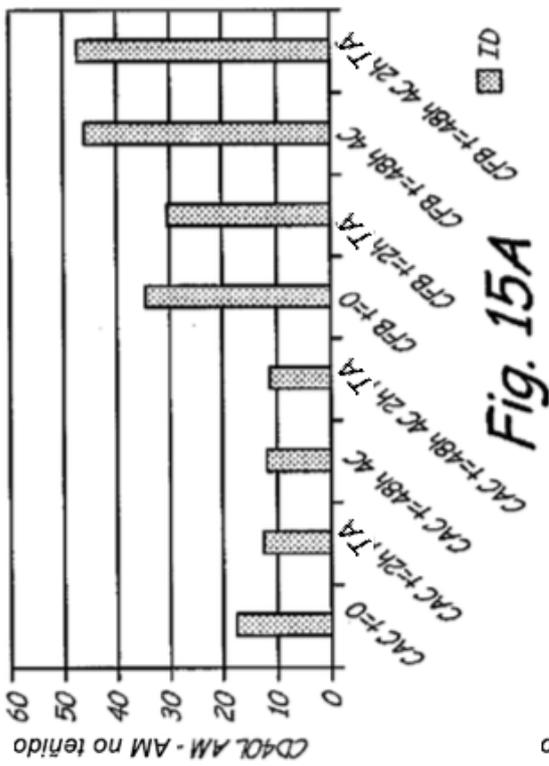


Fig. 15A

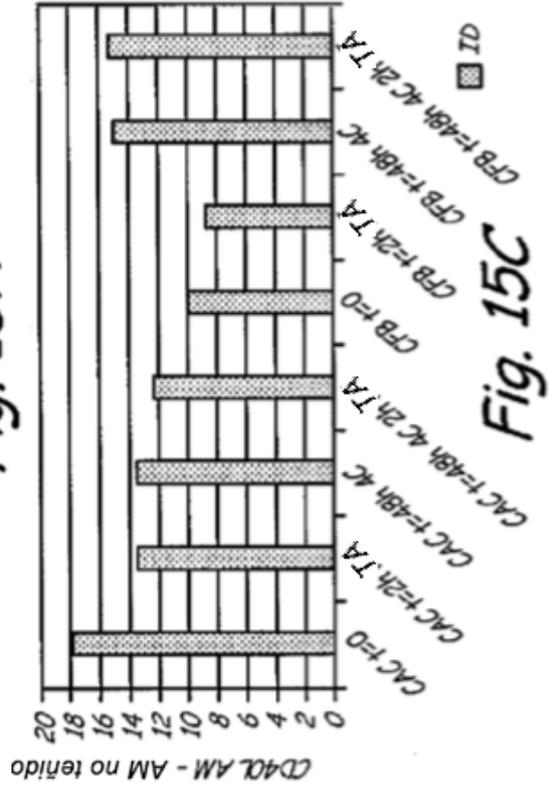


Fig. 15C

